

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

199 14 229.7

**Anmeldetag:**

29. März 1999

**Anmelder/Inhaber:**

Professor Dr. med. Winfried Siffert,  
Essen, Ruhr/DE

**Bezeichnung:**

Genveränderung im Gen für die Gβ3-Untereinheit des  
humanen G-Proteins

**IPC:**

C 12 N, A 61 K

Die Akte dieser Patentanmeldung ist ohne vorherige Offenlegung vernichtet  
worden.

München, den 28. Mai 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Hiebing', is written over the printed name.

Hiebing

BEST AVAILABLE COPY

GS/jo 980364X1  
26. März 1999

### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Nukleinsäuresequenz codierend für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, sowie die Verwendung von G $\beta$ 3-Untereinheiten der G-Proteine zur Ermittlung des Risikos, an einer Krankheit, die mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu erkranken.

Heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) haben eine herausragende Bedeutung bei der intrazellulären Signaltransduktion. Sie vermitteln die Weiterleitung extrazellulärer Signale nach Stimulation von Hormonrezeptoren und anderen Rezeptoren, welche nach Rezeptoraktivierung eine Konformationsänderung durchmachen. Dies führt zur Aktivierung von G-Proteinen, welche nachfolgend intrazelluläre Effektoren (z.B. Ionenkanäle, Enzyme) aktivieren oder hemmen können. G-Proteine steuern die intrazelluläre Signalverarbeitung nach hormoneller Stimulation heptahelikaler Rezeptoren in der Zellmembran, aber auch nach Stimulation von Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Zu den regulierten Zellfunktionen gehören unter anderem Zellteilung und Zellwachstum, Kontraktion, Freisetzung von Zellinhaltsstoffen u.v.m..

Heterotrimere G-Proteine sind aus drei Untereinheiten, den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten, zusammengesetzt. Bislang wurden mehrere unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten, 5  $\beta$ -Untereinheiten und ca. 12  $\gamma$ -Untereinheiten mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden nachgewiesen (Birnbaumer, L. and Birnbaumer, M., Signaltransduction by G proteins: 1994 edition. J.Recept.Res. 15:213-252,1995; Offermans, S. and Schultz, G.

✓ Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 350:329-338, 1994; Nürnberg, B., Gudermann, T. and Schultz, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. J. Mol. Med. 73:123-132, 1995; Neer, E.J. Heterotrimeric G proteins: Organizers of Transmembrane Signals. Cell 80:249-257, 1995; Rens-Domiano, S. and Hamm, H.E. Structural and functional relationships of heterotrimeric G proteins. FASEB J. 9:1059-1066, 1995).

○ Die rezeptorvermittelte Aktivierung bestimmter  $\alpha$ -Untereinheiten kann durch Vorbehandlung mit Pertussistoxin (PTX) gehemmt werden. Dazu gehören insbesondere die  $\alpha$ -Isoformen  $\alpha$ -i1,  $\alpha$ -i2 und  $\alpha$ -i3 sowie unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten. Solche G-Proteine werden auch als "PTX-sensitive G-Proteine bezeichnet.

○  $\beta$ -Untereinheiten erfüllen wesentliche Funktionen bei der G-Protein-Aktivierung sowie bei der Modulation intrazellulärer Reaktionen. Alle bisher bekannten G-Protein- $\beta$ -Untereinheiten weisen auf der Ebene der Nukleotidsequenz und auf der Ebene der Aminosäuresequenz hohe Homologien auf. Dabei werden diese Ähnlichkeiten nicht nur innerhalb der humanen  $\beta$ -Untereinheiten ( $G\beta 1$ ,  $G\beta 2$ ,  $G\beta 3$ ) gefunden, sondern auch im Vergleich zu  $\beta$ -Untereinheiten anderer Spezies, beispielsweise Fruchtfliege oder Hefe.

Kürzlich konnte im humanen GNB3-Gen, das für die  $G\beta 3$ -Untereinheit kodiert, eine Basenveränderung in Exon 10 (C825T) beschrieben werden, die zum alternativen Spleißen von Exon 9 führt. Das alternative Spleißen wird durch eine kryptische Spleißstelle in Exon 9 begünstigt, wobei der entfernt liegende Basenaustausch C825T das Spleißen verstärkt. Das alternative Spleißprodukt ( $G\beta 3s$ ) weist einen Verlust von 123 bp (= 41 Aminosäuren) auf. Das GNB3-825T-Allel ist mit gesteigerter

Aktivierbarkeit von G-Proteinen und der essentiellen Hypertonie assoziiert (Siffert, W., Roszkopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., and Horsthemke, B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. Nat.Genet. 18(1):45-48, 1998; Clapham, D.E. and Neer, E.J. G protein  $\beta\gamma$  subunits. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 37:167-203, 1997; Hamm, H.E. and Gilchrist, A. Heterotrimeric G proteins. Curr.Opin.Cell Biol. 8:189-196, 1996).

Dieses humane GNB3-Gen ist von Levine et al. (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T. Jr., Helman, L.J. und Ahn, T.G. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (6), 2329-2333 (1990)) beschrieben worden.

Gegenstand der Erfindung ist eine neue humane cDNA für die G $\beta$ 3-Untereinheit von humanem G-Protein.

Überraschenderweise hat es sich nämlich herausgestellt, daß es im humanen GNB3-Gen einen weiteren Polymorphismus gibt, der im folgenden "C1429T" genannt wird. Dieser Polymorphismus findet sich an Position 1429 der cDNA. Dies entspricht dem Exon 11 der prä-mRNA, jedoch außerhalb des offenen Leserahmens im 3' nicht-translatierten Bereich.

Dieser Polymorphismus steht in einem ausgeprägten Verteilungsungleichgewicht mit dem bekannten C825T-Polymorphismus, derart, daß nahezu alle GBN3-825C-Allele den Genotyp 1429C und nahezu alle GBN3-825T-Allele den Genotyp 1429T aufweisen. Somit eignet sich dieser Polymorphismus C1429T ebenso gut wie der Polymorphismus C825T zum Nachweis der gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen.

Der Polymorphismus C1429T ist bezogen auf die Sequenz der cDNA, wie sie von Levine und Mitarbeitern beschrieben wurde. Hierbei



kommt es an Position 1429 der cDNA zu einem Austausch des C durch ein T:

1381 ggcctgggtg gtatagggcg tttggccctg tgactatggc tctggcac(c/t)a  
ctagggtcct

In Anhang 1 ist die vollständige cDNA-Sequenz aufgelistet.

Bezogen auf die genomische Sequenz des GBN3 Lokus, wie er von Ansari-Lari und Mitarbeitern beschrieben wurde (Ansari-Lari, M.A., Muzny, D.M., Lu, J., Lu, F., Lilley, C.E., Spanos, S., Malley, T. und Gibbs, R.A., A gene-rich cluster between the CD4 and triosephosphate isomerase genes at human chromosome 12p13. Genome Res. 6 (4), 314-326 (1996)), ist dieser Polymorphismus wie folgt lokalisiert (C59308T):

59281 TTGGCCCTGT GACTATGGCT CTGGCAC(C/T)AC TAGGGTCCTG  
GCCCTCTTCT TATTCATGCT

In Anhang 2 ist die vollständige genomische Sequenz aufgelistet.

Der Nachweis dieses Polymorphismus erfolgt durch dem Fachmann geläufige Methoden wie spezifische Hybridisierung, Sequenzierung, PCR- Reaktion mit anschließender Restriktionsanalyse, DNA - Chip- Technologie, single strand conformation polymorphism etc.. In einem beispielhaften Versuch erfolgte der Nachweis durch Amplifikation des entsprechenden Genabschnitts und anschließende Analyse des Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus, bei dem die Restriktionsenzyme *BanI*, *BshNI*, *Eco64I* oder deren Isoschizomere verwendet werden.

Als Ergebnis findet sich eine große Übereinstimmung zwischen dem Genotyp an Positionen 825 und 1429:

Genotyp an Position 825 der GNB3 cDNA	Genotyp TT bei Position 1429 der cDNA	Genotyp TC bei Position 1429 der cDNA	Genotyp CC bei Position 1429 der cDNA
TT 119	111 (93,3 %)	8 (6,7%)	0
TC 116	3 (2,6 %)	103 (88,8 %)	10 (8,6 %)
CC 124	0 (0 %)	2 (1,6 %)	122 (98,4 %)

Die neue Nukleinsäuresequenz kann zur Herstellung von Antisense-Arzneimitteln zur Therapie oder Prävention von Krankheiten dienen, wobei eine zu dieser Nukleinsäuresequenz komplementäre Nukleinsäuresequenz zur Herstellung des Antisense-Arzneimittels eingesetzt wird. Die Patienten können dabei z.B. mit Antisense-Oligonukleotiden oder Vektoren zur Verhinderung der Transkription oder Translation der G $\beta$ 3-Untereinheit behandelt werden.

Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung von von  $\beta$ 3-Untereinheiten der G-Proteine zur Ermittlung des Risikos, an einer Krankheit, die mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu erkranken.

Obwohl die G $\beta$ 3s- Spleißvariante, die den Polymorphismus C1429T aufweist bzw. auf den Polymorphismus C825T zurückzuführen ist, in Kombination mit den G-Protein-Untereinheiten G $\alpha$ i2 und G $\gamma$ 5 ein funktionelles Heterotrimer bilden kann, war es unklar, auf welche Weise G $\beta$ 3s zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen führt.

Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß die Untereinheit G $\beta$ 3s zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen führt. Der Nachweis der gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen erfolgte über die Transfektion der entsprechenden cDNAs und Expression von G $\beta$ 3 und G $\beta$ 3s im dem Fachmann wohlbekannten COS-7-Transfektionssystem. Hier zeigte sich, daß die Aktivierbarkeit

von G-Proteinen nach Transfektion von G $\beta$ 3s gegenüber G $\beta$ 3 deutlich gesteigert ist (Fig.1). Zur Quantifizierung der Aktivierbarkeit von G-Proteinen wurde hier der Einbau von radioaktiv markiertem [35S]GTP $\gamma$ S in G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten nach Stimulation mit dem Peptid Mastoparan-7 (Mas-7) gemessen.

Ähnliche Ergebnisse lassen sich im Sf9-Insektenzellen-Expressionssystem erzielen (Fig.2). Hier wird der m2-muskarinerge Rezeptor zusammen mit den G-Protein-Untereinheiten G $\alpha$ i3 und G $\gamma$ 5 und entweder G $\beta$ 3 oder G $\beta$ 3-s im Sf9-System exprimiert. Nach Stimulation mit dem Agonisten Carbachol werden in Gegenwart von G $\beta$ 3-s eine gesteigerte Potenz und eine gesteigerte Effizienz des Agonisten Carbachol bezogen auf die Stimulierbarkeit von G-Proteinen beobachtet.

Diese Versuche zeigen, daß die Spleißvariante G $\beta$ 3-s für eine gesteigerte Aktivierung von G-Proteinen ursächlich verantwortlich ist. Ferner beweisen diese Versuche, daß das Protein sich für eine Gentherapie für Krankheiten, die mit einer solchen G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert sind, im Sinne der Erzielung einer gesteigerten zellulären Reaktivität eignet.

Unter Krankheiten, die mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert sind, sind solche Erkrankungen zu verstehen, bei denen das G-Protein in der Signaltransduktion involviert ist und seine Funktion nicht in physiologischer Weise erfüllt. Die Fehlsteuerung kann eine Reihe von Ursachen haben, beispielsweise eine Veränderung im Strukturgen oder eine veränderte Genexpression. Die vorliegende Erfindung betrifft Krankheiten, die mit dem oben beschriebenen GNB3-825T-Allel bzw. GNB3-1429T-Allel assoziiert sind. Dazu zählen Diabetes mellitus (Typ-2), Übergewicht und Adipositas, koronare Herzkrankheit, Immunerkrankungen infolge einer verstärkten Funktion des Immunsystems, und Risikoschwangerschaften mit der Gefahr einer vorzeitigen Geburt (Frühgeburt).

Die folgenden Beispiele beziehen sich zwar auf Untersuchungen mit dem GNB3-825T-Allel. Aufgrund der großen Übereinstimmung (Kopplungsgleichgewicht) zwischen dem Genotyp an Positionen 825 und 1429 sind diese Beispiele und die aus den Versuchsergebnissen gezogenen Schlußfolgerungen für das GNB3-1429T-Allel ebenso gültig.

#### 1. Vorhersage des Diabetes mellitus (Typ-2)

Der Typ-2-Diabetes (Synonyme: Altersdiabetes, nicht-Insulinpflichtiger Diabetes) ist eine schwerwiegende Erkrankung mit hoher kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität. Genetische Einflüsse und Übergewicht tragen wesentlich zur Pathogenese bei. Der Typ-2-Diabetes beginnt häufig als Insulinresistenz, welche zunächst durch eine gesteigerte Insulinsekretion kompensiert wird, so daß die betroffenen Individuen symptomlos (euglykämisch) bleiben. Erst wenn die gesteigerte Insulinsekretion nicht mehr aufrecht erhalten werden kann, kommt es zum Diabetes mit gesteigerten Blutzuckerspiegeln. Auf zellulärer Ebene können Veränderungen in Komponenten der Insulinsignaltransduktion, z.B. bei Insulin- Rezeptor- Substrat 1 (IRS-1), PI-3-Kinasen, Proteinkinasen, etc. eine Insulinresistenz bewirken. Aber auch nach einer Zellstimulation mit Agonisten (z.B. Angiotensin II), die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren, kann eine zelluläre Insulinresistenz herbeigeführt werden. Die Wirkung einer nachfolgenden Stimulation mit Insulin ist dann deutlich vermindert (Polonsky, K.S., Sturis, J., and Bell, G.I. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - A genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. N.Engl.J.Med. 334:777-783, 1996; O'Doherty, R., Stein, D., and Foley, J. Insulin resistance. Diabetologia 40 Suppl 3:B10-5:B10-5, 1997; Kahn, C.R., Vicent, D., and Doria, A. Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. Annu.Rev.Med. 47:509-531, 1996; Hansen, T., Andersen, C.B., Echwald, S.M., Urhammer, S.A., Clausen, J.O., Vestergaard, H., Owens, D., Hansen, L., and Pedersen, O. Identification of a

common amino acid polymorphism in the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase: effects on glucose disappearance constant, glucose effectiveness, and the insulin sensitivity index. Diabetes 46(3):494-501, 1997; Folli, F., Kahn, C.R., Hansen, H., Bouchie, J.L., and Feener, E.P. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels - A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. J.Clin.Invest. 100:2158-2169, 1997; Zhang, Y., Wat, N., Stratton, I.M., Warren-Perry, M.G., Orho, M., Groop, L., and Turner, R.C. UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and beta3-adrenergic receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. Diabetologia 39:1505-1511, 1996; Almind, K., Bjorbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Echwald, S., and Pedersen, O. Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet 342:828-832, 1993; Laakso, M., Malkki, M., Kekäläinen, P., Kuusisto, J., and Deeb, S.S. Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin-dependent diabetes. J.Clin.Invest. 94:1141-1146, 1994).

Diese G-Protein-Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung von IRS-1 an Serinresiduen, wodurch die durch Insulin induzierte Phosphorylierung an Tyrosinresiduen reduziert wird. Als Folge davon kommt es zu einer reduzierten Interaktion von IRS-1 mit dem Insulinrezeptor und der PI-3-Kinase, d.h. zu einer verminderten Insulinwirkung. Eine gesteigerte Aktivierbarkeit von G-Proteinen, die durch das GNB3 825T-Allel und die damit verbundene Spleißvariante Gβ3-s in vivo bewirkt wird, verstärkt die Neigung zur Insulinresistenz deutlich.

Es hat sich nun gezeigt, daß bei gleichzeitigem Vorliegen von Mutationen in Komponenten der Insulinsignaltransduktion (IRS1-Gen, 3931A-Variante; Gly971Arg; p85α- regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase (1020 G →A; Codon 326 Met →Ile;

$\beta$ 3-adrenerger Rezeptor (Trp64Arg);  $\beta$ 2-adrenerger Rezeptor (hier insbesondere die Arg16Gly- Variante und die Gln27Glu-Variante); Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ; Leptin oder der Leptinrezeptor), welche zur Insulinresistenz führen, und dem GNB3-825T-Allel, die Neigung zur Insulinresistenz und zum Diabetes drastisch ansteigt. Dieser Zusammenhang eröffnet die Möglichkeit, eine mit dem GNB3-825T-Allel assoziierte Diabetes mellitus vom Typ 2 zu diagnostizieren und eine derart genetisch bedingte Neigung zur Diabetes mellitus vom Typ 2 bei noch gesunden bzw. beschwerdefreien Personen vorherzusagen.

Zum Beweis wurde die DNA von über 700 Patienten mit Typ-2-Diabetes und von 1400 gesunden Kontrollpersonen gewonnen. Die Häufigkeiten des GNB3-825T-Allels und der IRS-1-Gly971Arg-Variante wurden verglichen. Tabelle I zeigt zunächst einen Vergleich der Allelfrequenzen bei Kontrollen und Fällen:

Tabelle I: Allelfrequenzen bei Kontrollen und Typ-2-Diabetikern

		Kontrollen			Diabetiker		
		Alle	Männer	Frauen	Alle	Männer	Frauen
Total, n		1464	962	502	720	320	400
Genotyp, n (%):							
GNB3	TT	116 (8)	83 (9)	33 (7)	61 (8)	32 (10)	29 (7)
	TC	585 (40)	360 (37)	225 (45)	345 (48)	161 (50)	184 (46)
	CC	763 (52)	519 (54)	244 (49)	314 (44)	127 (40)	187 (47)
	FT	0.28	0.27 <sup>1</sup>	0.29	0.32 <sup>2</sup>	0.35 <sup>3</sup>	0.30
IRS1	AA	5 (0)	4 (0)	1 (0)	8 (1)	4 (1)	4 (1)
	AG	159 (11)	108 (11)	51 (10)	108 (15)	58 (18)	50 (13)
	GG	1300 (89)	850 (88)	450 (90)	604 (84)	258 (81)	346 (87)
	FA	0.06	0.06	0.05	0.09 <sup>4</sup>	0.10 <sup>5</sup>	0.07 <sup>6</sup>
Alter (SD)		49 (10)	48 (10)	50 (9)	63 (9)	62 (9)	64 (9)
Alter bei Diagnose (SD)					46 (10)	45 (10)	47 (10)
BMI, kg / m <sup>2</sup> (SD)		26.9 (3.9)	27.0 (3.4)	26.3 (4.8)	28.9 (4.8)	28.4 (4.4) <sup>6</sup>	29.3 (5.0)
Nephropathy, n (%)					198 (31)	105 (36)	93 (28)
Hypertension, n (%)					464 (67)	181 (59)	283 (73)

Werte entsprechen n (%) für Allele und Diabetes-assoziierte Erkrankungen, und Mittelwerte (SD) für kontinuierliche Variablen. <sup>1</sup>, p < 0.02 ( $\chi^2$  = 8.1) versus Kontrollfrauen; <sup>2</sup>, p <

0.001 ( $\chi^2 = 14.4$ ) versus alle Kontrollen; <sup>3</sup>,  $p < 0.001$  ( $\chi^2 = 20.0$ ) versus Kontrollmänner; <sup>4</sup>,  $p < 0.005$  ( $\chi^2 = 12.9$ ) versus alle Kontrollen; <sup>5</sup>,  $p < 0.01$  ( $\chi^2 = 13.2$ ) versus Kontrollmänner; <sup>6</sup>,  $p = 0.14$  ( $\chi^2 = 3.1$ ) versus Kontrollfrauen.

Die folgenden Tabellen IIa und IIb zeigen das Risiko für Träger des GNB3-825T-Allels bzw. Träger des IRS1-3931A-Allels (einfache Effekte, Tabelle II.1) bzw. für Träger beider Allele (Kombinierte Effekte, Tabelle II.2), an Typ-2-Diabetes zu erkranken. Das Risiko ist hier als altersadjustierte Odds Ratio ausgedrückt, wobei die Odds Ratio für Fall-Kontroll-Studien etwa dem relativen Risiko bei prospektiven Studien entspricht.

Tabelle II: Odds Ratios für Diabetes für Träger des GNB3-T825-Allels, des IRS1-A-3931 Allels oder beider Allele

Dargestellt sind altersadjustierte Odds ratios.

### II.1 Einfache Effekte

Gene	Allele	Alle				Männer				Frauen			
		Kontr. (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-Wert
GNB3	TT/CC	116 763	61 314	1.25 (0.81- 1.92)	0.3180	83 519	32 127	1.44 (0.83- 2.51)	0.2002	33 244	29 187	1.22 (0.60 - 2.46)	0.5882
GNB3	TC/CC	585 763	345 314	1.48 (1.17- 1.87)	0.0011	360 519	161 127	1.86 (1.35- 2.57)	0.0002	225 244	184 187	1.12 (0.79 - 1.58)	0.5351
GNB3	TT + TC/CC	701 763	406 314	1.44 (1.15- 1.80)	0.0015	443 519	193 127	1.78 (1.31- 2.43)	0.003	258 244	213 187	1.13 (0.80- 1.58)	0.4834
IRS1	AA/GG	5 1300	8 604	2.26 (0.53- 9.59)	0.2686	4 850	4 285	1.71 (0.32- 9.12)	0.5300	1 450	4 346	6.74 (0.42- 109.57)	0.1797
IRS1	AG/GG	59 1300	108 604	1.35 (0.97- 1.89)	0.0802	108 850	58 258	1.76 (1.14- 2.69)	0.0100	51 450	50 346	0.99 (0.57- 1.72)	0.9762
IRS1	AA + AG/GG	164 1300	116 604	1.38 (1.00- 1.92)	0.0531	112 850	62 258	1.75 (1.15- 2.67)	0.0086	52 450	54 346	1.07 (0.62- 1.83)	0.8122



Tabelle II: Odds Ratios für Diabetes für Träger des GNB3-T825-Allels, des IRS1-A-3931 Allels oder beider Allele

Dargestellt sind altersadjustierte Odds ratios.

## II.2 Kombinierte Effekte

		Alle				Männer				Frauen			
Gene	Allele	Kontr. (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-Wert
GNB3 (IRS1 GG)	TT / CC	106 / 684	50 / 264	1.13 / (0.70-1.81)	0.6156	75 / 461	25 / 104	1.31 / (0.71-2.42)	0.3926	31 / 223	25 / 160	1.09 / (0.52-2.32)	0.8157
GNB3 (IRS1 GG)	TC / CC	510 / 684	290 / 264	1.53 / (1.19-1.96)	0.0010	314 / 461	129 / 104	1.90 / (1.33-2.70)	0.0004	196 / 223	161 / 160	1.19 / (0.82-1.72)	0.3600
GNB3 (IRS1 GG)	TT+TC/ CC	616 / 684	340 / 264	1.46 / (1.15-1.86)	0.0022	389 / 461	154 / 104	1.78 / (1.27-2.50)	0.0008	227 / 223	186 / 160	1.18 / (0.82-1.68)	0.3743
IRS1 (GNB3 CC)	AA + AG / GG	79 / 684	50 / 264	1.48 / (0.90-2.43)	0.1198	58 / 461	23 / 104	1.78 / (0.93-3.38)	0.0782	21 / 223	27 / 160	1.33 / (0.59-3.00)	0.4984
IRS1 + GNB3	TT + AA or AG/ CC + GG	10 / 684	11 / 264	3.38 / (1.13-10.08)	0.0291	8 / 461	7 / 104	4.03 / (1.12-14.56)	0.0333	2 / 223	4 / 160	3.39 / (0.49-31.60)	0.1975
IRS1 + (GNB3 )	TC + AA or AG / CC + GG	75 / 684	55 / 264	1.69 / (1.05-2.73)	0.0311	43 / 461	32 / 104	2.82 / (1.52-5.23)	0.0010	28 / 223	23 / 160	0.89 / (0.41-1.93)	0.7706
IRS1 + GNB3	TC or TT + AA or AG / CC + GG	85 / 684	66 / 264	1.87 / (1.19-2.92)	0.0062	54 / 461	39 / 104	2.99 / (1.69-5.30)	0.0002	31 / 223	27 / 160	1.05 / (0.51-2.17)	0.8959

Man erkennt eine deutliche Risikosteigerung für den Typ-2-Diabetes für Träger des GNB3-825T-Allels bzw. Träger des IRS1-3931A-Allels (Tabellen II.1 und II.2). Eine drastische Risikosteigerung findet man bei Individuen, bei denen beide Gene verändert sind. Somit kann der Nachweis des GNB3-825T-Allels dazu dienen, bei den betroffenen Personen die Neigung für eine Erkrankung an Typ-2-Diabetes festzustellen bzw. eine genetisch bedingte Ursache einer bereits aufgetretenen Erkrankung zu ermitteln.

## 2. Vorhersage von Adipositas/Übergewicht

Die Regulation des Body Mass Index (BMI), ein Maß für das Verhältnis von Körpergewicht zu Körpergröße, wird durch viele Gene bestimmt. Übergewicht ist zu etwa 40% genetisch bedingt, wird aber auch durch überhöhte Kalorienzufuhr bei bestehendem Bewegungsmangel verursacht. Die G $\beta$ 3-s Spleißvariante ist mit dem zellulären Phänotyp eines gesteigerten Zellwachstums verbunden. Damit ist es auch möglich, daß das GNB3-825T-Allel zu einem gesteigerten Körperwachstum, u.a. Übergewicht, prädisponiert, und epi- und hypostatische Effekte ausüben kann. Dabei kann ebenso wie beim Diabetes mellitus (Typ 2) ein Zusammenhang bestehen mit Veränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg), im Gen, das für den  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptor kodiert (Trp64Arg-Variante) und im Gen, das für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor kodiert, hier insbesondere die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante.

Untersuchungen an transgenen Mäusen zeigten, daß das Fehlen des Gens, welches für das IRS-1-Protein kodiert, im Gegensatz dazu zu einer starken Verzögerung des Körperwachstums führt (Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., Sekihara, H., Yoshioka, S., Horikoshi, H., Furuta, Y., Ikawa, Y., Kasuga, M., Yazaki, Y., and Aizawa, S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372:182-186, 1994).

Um die Korrelation von Adipositas mit dem Vorliegen des GNB3-825-Nukleotids und der Status des IRS1-Gens bezüglich des Vorliegens der Gly971Arg-Variante zu überprüfen, wurde der BMI bei 20-30-jährigen gesunden Männern, bei denen gleichzeitig der Status des GNB3-825-Nukleotids und der Status des IRS1-Gens bezüglich des Vorliegens der Gly971Arg-Variante untersucht wurde, gemessen. Das Ergebnis ist in Figur 3 dargestellt.

Fig. 3 zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Werte für den BMI. Bei Vorliegen des häufigeren IRS1-"GG"-Genotyps läßt sich mit dem GNB3-825T-Allel im Vergleich zum GNB3-C825-Allel eine signifikante Tendenz zu erhöhtem BMI nachweisen. Die Odds Ratio für das 75%-Quartil gegenüber dem 25 % Quartil beträgt 2,5. Dagegen wird der Neigung zu gesteigertem BMI bei Trägern des GNB3-825T-Allels bei gleichzeitiger Anwesenheit des IRS1-3931A-Allels (Gly971Arg-Variante) deutlich entgegengewirkt. Dies illustriert den interaktiven Effekt von GNB3 und IRS1 auf den BMI. Somit läßt sich das Vorliegen des GNB3-825T-Allel zuverlässig mit Adipositas korrelieren. Damit ist es möglich, eine Neigung zu Adipositas bei Trägern dieses Allels, insbesondere solchen, denen gleichzeitig das IRS1-3931A-Allel (Gly971Arg-Variante) fehlt, vorherzusagen.

825T-Allelträger weisen, wie z.B. in der DE 196 19 362 A1 beschrieben, ein erhöhtes Risiko auf, an einer Hypertonie zu erkranken. Da Übergewicht und Adipositas in sehr starkem Maße für kardiovaskuläre Erkrankungen prädisponieren, wurde untersucht, ob junge Personen mit normalem Blutdruck, die ein 825T-Allel tragen, bereits ein erhöhtes Risiko für Übergewicht und Adipositas aufweisen. Dazu wurde bei 277 jungen, normotensiven Männern die Körpergröße und das Körpergewicht bestimmt und der Blutdruck gemessen. Übergewicht wird als ein  $\text{BMI} \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$  definiert und Adipositas als  $\geq 27,0 \text{ kg/m}^2$ . Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen BMI und Blutdruckwerten. Die Frequenz des 825T-Allels steigt über vom 1. zum 4. BMI-Quartil linear an. Für homozygote 825T-

Allelträger lassen sich die folgenden Risiken (odds ratios; OR) berechnen

a) BMI  $\geq 25,0$  kg/m<sup>2</sup> versus BMI  $< 25$  kg/m<sup>2</sup> (Übergewicht versus Normalgewicht):

OR TT/CC = 2,5 (1,1 - 6,1; p = 0,03); OR TC/CC 1,5 (0,8 - 2,6; p = 0,2)

b) BMI  $> 27$  kg/m<sup>2</sup> versus BMI  $< 25$  kg/m<sup>2</sup> (Adipositas versus Normalgewicht):

OR TT/CC = 5,0 (1,4 - 18,3; p = 0,0083); OR TC/CC = 2,2 (0,8 - 6,3; p = 0,13).

Somit ergibt sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Vorhandensein eines 825T-Allels und der Neigung zu Übergewicht und Adipositas. Dies erklärt unter anderem zum Teil das erhöhte Risiko von 825T-Allelträgern für Hypercholesterämie, Diabetes, Hypertonie und koronare Herzkrankheit/Myokardinfarkt.

GNB3 825T - Allel, BMI und Blutdruckwerte

		BMI Quartile				
GNB3	Alle	1 < 21.7	2 21.7 - 23.4	3 23.4- 25.0	4 $\geq 25.0$	> 27 kg/m <sup>2</sup>
TT	28 (10)	2 (3)	6 (8)	9 (13)	11 (16)	5 (23)
TC	121 (44)	27 (39)	27 (40)	34 (49)	33 (47)	11 (50)
CC	128 (46)	40 (58)	36 (52)	26 (38)	26 (37)	6 (27)
$\Sigma$	277	69	69	69	70	22
fT (%)	31.9	22.5	28.3	37.7	39.3	47.7
Alter (Jahre)	25.6 (3.4)	24.8 (3.6)	25.6 (3.2)	25.3 (3.4)	26.4 (2.9)	26.5 (2.9)
Größe (cm)	180.4 (7.3)	180.8 (6.4)	180.5 (7.4)	180.7 (7.1)	179.6 (7.4)	181.0 (5.9)

Gewicht (kg)	76.5 (9.8)	67.4 (5.2)	73.1 (6.3)	78.9 (7.1)	86.2 (8.7)	93.5 (6.9)
BP syst (mm Hg)	129.8 (11.1)	126.3 (9.1)	130.2 (9.4)	130 (11.8)	133 (12.9)	135.9 (10.7)
BP diast (mm Hg)	79.1 (7.9)	75.8 (7.9)	79.4 (5.5)	79.7 (7.3)	81.9 (9.2)	84.3 (9.8)

Genotypen sind als n (%) angegeben und kontinuierliche Variablen als Mittelwerte (Standardabweichung); fT = 825T Allelfrequenz; BMI (body mass index) ist als kg/m<sup>2</sup> angegeben. BP syst = systolischer Blutdruck; BP diast = diastolischer Blutdruck.

### 3. Vorhersage von koronarer Herzkrankheit und Atherosklerose

Es ist bereits bekannt, daß koronare Herzkrankheit mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert sein können. Um einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer koronaren Herzkrankheit und dem Vorhandensein des GNB3-825T-Allels zu überprüfen, wurden Patienten mit angiographisch ausgeschlossener koronarer Herzkrankheit, mit koronarer Herzkrankheit (ohne Myokardinfarkt), mit einem Myokardinfarkt und mit mehr als einem Myokardinfarkt auf das Vorhandensein dieses Alles überprüft. Das Ergebnis ist in Fig. 4 dargestellt.

Fig. 4 zeigt die Frequenz des GNB3-825T-Allels bei Patienten mit angiographisch ausgeschlossener koronarer Herzkrankheit (KHK), mit KHK (ohne Myokardinfarkt; MI), mit einem Myokardinfarkt (MI) und mit mehr als einem Myokardinfarkt.

Man erkennt einen deutlichen Anstieg der Frequenz des GNB3-825T-Allels bei KHK und MI. Das Risiko für KHK und MI wird durch das GNB3-825T-Allel gegenüber Kontrollen ohne KHK etwa verdoppelt.

Patienten mit Mutation im IRS-1 Protein (3931A-Allel; Gly971Arg-Variante) erfahren jedoch eine deutliche

Risikoreduktion um bis zu 50 % bei Vorliegen des GNB3-C825- oder des GNB3-825T-Allels. Diese Veränderung im IRS-1-Protein übt also hypostatische Effekte aus, d.h. diese Variante schützt vor koronarer Herzkrankheit.

Vergleicht man Patienten mit KHK mit Individuen mit koronarangiographisch ausgeschlossener KHK, so ergeben sich die folgenden Odds Ratios:

KHK positiv	KHK negativ	OR	P - Wert
GNB3 + IRS1-Status	GNB3 + IRS1-Status		
TT/TC + AG/AA	TT/TC + GG	0,94	Nicht signifikant
TT/TC + GG	CC + GG	1,4	0,003
TT/TC + GG	CC + AG/AA	2,8	0,002

Damit ist eine Korrelation zwischen dem Vorliegen des GNB3-825T-Allels mit dem Auftreten koronarer Herzkrankheit belegt. Somit ist es möglich, eine Neigung zu koronarer Herzkrankheit bei Trägern dieses Allels, insbesondere solchen, denen gleichzeitig das IRS1-3931A-Allel (Gly971Arg-Variante) fehlt, vorherzusagen.

Ein besonderer Anwendungsbereich ist die Vorhersage einer koronaren Herzkrankheit, aber auch allgemein des kardiovaskulären Risikos (Bluthochdruck, usw.) bei Frauen, mit dem Ziel, diese einer gezielten, post-menopausalen Hormontherapie mit weiblichen Sexualhormonen zuzuführen, um das kardiovaskuläre Risiko zu vermindern.

Ein weiterer Anwendungsbereich ist die Vorhersage eines erhöhten Risikos für Myokardinfarkte und plötzlichen Herztod. Dies hängt u.a. damit zusammen, daß G-Proteine auch Ionenkanäle steuern. Genauer gesagt, steuern die  $G\alpha$ - und  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen die Funktion vielfältiger Ionenkanäle, z.B. von  $Na^+$ -Kanälen,  $Ca^{2+}$ -Kanälen und  $K^+$ -Kanälen. Eine genau abgestimmte Regulation solcher Ionenkanäle ist für alle elektrisch erregbaren Gewebe von großer Wichtigkeit, insbesondere für das Herz (De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E., Gurnett, C.A., and Campbell, K.P. Direct binding of G-protein  $\beta\gamma$  complex

to voltage-dependent calcium channels. Nature 385(6615):446-450, 1997; Ma, J.Y., Catterall, W.A., and Scheuer, T. Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G protein  $\beta\gamma$  subunits. Neuron 19(2):443-452, 1997; Kofuji, P., Davidson, N., and Lester, H.A. Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying  $K^+$  channels are activated by  $G\beta\gamma$  subunits and function as heteromultimers. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:6542-6546, 1995; Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D.E.  $G\beta\gamma$  binds directly to the G protein-gated  $K^+$  channel,  $I_{KACH}$ . J.Biol.Chem. 270:29059-29062, 1995).

Es hat sich gezeigt, daß Personen, die das GNB3-T825-Allel tragen, eine verstärkte Aktivität myokardialer  $K^+$ - Kanäle zeigen. Dies führt zu einer beschleunigten Repolarisation der Herzmuskelzelle, und damit zu einer verkürzten Refraktärzeit. Diese Personen unterliegen damit einem erhöhten Risiko für Herzrhythmusstörungen, insbesondere ventrikuläre Tachykardien, Extrasystolen, Kammerflattern und Kammerflimmern. Sie tragen ein verstärktes Risiko für einen plötzlichen Herztod auch im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts.

Schließlich zeigen Träger des GNB3-825T-Allels bereits im Alter von 20 - 30 Jahren deutliche Veränderungen der Eigenschaften von Blutgefäßen. Besonders auffällig sind eine erhöhte Pulswellengeschwindigkeit, ein gesteigertes Schlagvolumen des Herzens und ein erhöhter Pulsdruck. Diese Phänomene sind Ausdruck einer früh einsetzenden Neigung zu einer erhöhten Steife der Blutgefäße (verminderte Compliance) als Indikator für eine Atherosklerose. Die Genotypisierung zur Feststellung des GNB3-C825T-Allelstatus ist damit geeignet, ein erhöhtes Risiko für die Atherosklerose festzustellen.

#### 4. Vorhersage einer erhöhten Cholesterinkonzentration im Blut

Es ist allgemein bekannt, daß Menschen mit erhöhter Konzentration des Gesamtcholesterin im Blut ein erhöhtes Risiko für koronare Herzkrankheit und Herzinfarkt zuzuordnen ist. Es wurden 232 Personen im Alter von 18 - 40 Jahren bezüglich des C825T - Polymorphismus in GNB3 genotypisiert und das Gesamtcholesterin im Serum wurde mittels Standardmethodik quantifiziert. Nachfolgend wurden die gemessenen Cholesterinkonzentrationen (mg/dl) in Quartile aufgeteilt, und der Genotyp am GNB3 - Locus wurde den Quartilen zugeordnet. Die niedrigste Frequenz des 825T-Allels findet sich mit 23,3 % im 1. Quartil, während die Frequenz des 825T-Allels in den Quartilen 2-4 deutlich höher liegt.

	Cholesterinkonzentration			
	1. Quartil - 163 mg/dl	2. Quartil - 181 mg/dl	3. Quartil - 212 mg /dl	4. Quartil > 212 mg/dl
TT	4 (9)	4 (8)	12 (17)	7 (12)
TC	13 (29)	21 (44)	32 (46)	28 (47)
CC	28 (62)	23 (48)	26 (37)	24 (41)
ft	23,3 %	30,2 %	40,0 %	35,6 %

Die Zahlen entsprechen n (%)

Vergleicht man die Genotypverteilung oberhalb des Medianwertes ( > 181 mg/dl; TT = 19; TC = 60; CC = 50; Frequenz des 825T-Allels: 38 %) mit der unterhalb des Medianwertes ( ≤ 181 mg/dl; TT = 8; TC = 34; CC = 51; Frequenz des 825T-Allels: 26,9 %), so errechnen sich die folgenden Risiken für Cholesterinwerte im Bereich oberhalb des Medians :

Odds ratio TT/CC = 2,4 (p = 0,053); odds ratio TC/CC = 1,8 (p < 0.05)



Damit ist das 825T- Allel mit einem erhöhten Risiko für eine Hypercholesterinämie verbunden.

Eine Genotypisierung am GNB3-Locus bietet also die Möglichkeit zur Feststellung eines erhöhten Risikos für eine Hypercholesterinämie und mit dem Ziel, betroffene Personen mit Pharmaka zu behandeln, die das erhöhte Cholesterin senken können. Dazu gehören insbesondere Hemmstoffe des Enzyms 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), z.B. Simvastatin, Pravastatin, Fluvastatin, Lovastatin, Atorvastatin und weitere sog. "Statine". Dazu gehören auch  $\beta$ -Sitosterin, Sitostanol-Ester (auch in Lebensmitteln), Fibrate und weitere Substanzen, die das Cholesterin senken.

Die genannten Pharmaka wirken hierbei auch als G-Protein Hemmer und lassen sich somit bei mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheiten therapeutisch einsetzen.

##### 5. Vorhersage einer verstärkten Funktion des Immunsystems

G-Proteine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren finden sich auch in allen Zellen des Immunsystems, insbesondere auch in Leukozyten. Chemotaxis von Zellen wird vorwiegend durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine vermittelt. Damit sollte auch das GNB3-825T-Allel zu einer gesteigerten Reaktionsfähigkeit des Immunsystems, insbesondere zu einer verstärkten Immunabwehr führen.

In der Tat weisen neutrophile Granulozyten von Trägern des GNB3-825T-Allels eine verstärkte Chemotaxis gegenüber dem Peptid fMLP auf (Fig.5). fMLP ist ein Peptid, welches für eine Vielzahl von bakteriellen Peptiden repräsentativ ist und chemotaktische Reaktionen stimuliert. Es dient daher als Testsystem für die Messung chemotaktischer Reaktionen von Zellen, welches dem Fachmann wohlbekannt ist. Der fMLP-Rezeptor aktiviert bekanntlich Pertussistoxin-sensitive G-Proteine. Die

Feststellung, daß Granulozyten von Trägern des GNB3-825T-Allels eine verstärkte fMLP-stimulierte Chemotaxis zeigen, steht in Einklang mit der Tatsache, daß die Chemotaxis von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt wird.

Dieses Phänomen läßt sich auch in anderen Leukozyten, z.B. Lymphozyten, nachweisen. Somit besteht eine Korrelation zwischen dem GNB3-825T- Allel und einer gesteigerten Chemotaxis von Zellen des Immunsystems, z.B. von neutrophilen Granulozyten, T- Lymphozyten, siehe auch 6., oder B-Lymphozyten.

Ferner beobachtet man bei Trägern des GNB3-825T-Allels eine verstärkte Proliferationsneigung von Zellen des Immunsystems, besonders auch nach Impfungen.

Gesunde Träger des GNB3-825T-Allels zeigen eine erhöhte Anzahl von Leukozyten und von CD4-positiven T-Lymphozyten (absolut und prozentual) mit gesteigertem CD4/CD8 - Quotienten. Fig.6 zeigt dies für die erhöhte Zahl von CD4 - Lymphozyten. Umgekehrt zeigen Träger des GNB3-825T-Allels zeigen auch eine verstärkte Neigung, nach einer HIV-Infektion an AIDS zu erkranken, siehe auch 7., auch im Zusammenhang mit dem Nachweis der oben beschriebenen Genveränderung in Chemokinrezeptoren, insbesondere einer  $\Delta 32$ - Deletion im CCR5- Rezeptor oder im Bereich des Promotors dieses Gens.

Schließlich beobachtet man bei betroffenen Personen eine verstärkte Freisetzung von immunmodulatorischen Substanzen, Hormonen und anderen Substanzen aus Leukozyten (Zytokine, Interleukine, Wachstumsfaktoren, Antikörper, gefäßwirksame Substanzen). In diesem Zusammenhang resultiert auch eine verstärkte Immunabwehr nach Transplantation von Organen oder Geweben (Niere, Herz, Knochenmark, Lunge, Haut, Leber etc.) mit der Gefahr der Transplantatabstossung. Außerdem folgt daraus eine verstärkte Neigung zu Autoimmunerkrankungen (Rheuma, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn) und zu allergischen

Erkrankungen, z.B. der Haut, der Atemwege oder anderer Organe (z.B. Neurodermitis, Heuschnupfen, Asthma bronchiale). Dies beobachtet man auch in Kombination mit dem Nachweis anderer Genveränderungen, z.B. im  $\beta 2$ -adrenergen Rezeptor, hier insbesondere die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante.

#### 6. Vorhersage einer gesteigerten Funktion von T-Lymphozyten

T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle im menschlichen Immunsystem und vermitteln dort die zelluläre Immunantwort. Eine gesteigerte Aktivierbarkeit von T-Lymphozyten hat unter anderem zur Folge, wie bereits erwähnt, daß transplantierte Organe (Niere, Leber, Herz, Lunge, Pankreas u.a.) einer verstärkten immunologischen Attacke unterliegen. In Fig. 7 ist als ein Beispiel die Chemotaxis menschlicher T-Lymphozyten nach Stimulation mit Stromal Cell-derived Factor 1 $\alpha$  (SDF 1 $\alpha$ ) dargestellt. Man erkennt eine deutlich gesteigerte chemotaktische Antwort der Zellen von 825T - Allelträgern im Vergleich zu Zellen von homozygoten C825-Allelträgern.

In ähnlicher Weise antworten T-Lymphozyten von 825T-Allelträgern verstärkt nach Stimulation mit anderen Chemokinen, z.B. RANTES. Dieses Verhalten erklärt sich daraus, daß die chemotaktische Antwort wesentlich von betagamma - Untereinheiten heterotrimerer G- Proteine gesteuert wird (Arai, H., Tsou, C.L., and Charo, I.F. Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: Evidence that directed migration is mediated by betagamma dimers released by activation of Galphai-coupled receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94(26):14495-14499, 1997).

Die verstärkte Aktivierung von T-Lymphozyten von 825T-Allelträgern äußert sich auch in einer gesteigerten Proliferation dieser Zellen im Vergleich zu T-Lymphozyten von homozygoten C825 Allelträgern.

Somit läßt sich insgesamt vorhersagen, daß die T-Lymphozyten von 825T-Allelträgern auf geeignete Stimulation stärker reagieren, was sich in einer gesteigerten Proliferation und Chemotaxis äußert. Dieses Verhalten manifestiert sich in Form einer gesteigerten zellulären Immunabwehr, was insbesondere bei Erkrankungen und operativen Eingriffen relevant ist, bei denen eine gesteigerte zelluläre Immunabwehr vorliegt. Zu nennen ist hier besonders die immunologische Attacke von transplantierten Organen (Niere, Leber, Pankreas, Knochenmark, Herz, etc.). Es läßt sich damit vorhersagen, daß 825T-Allelträger vermehrt dazu neigen, gegen solche transplantierten Organe eine akute oder chronische Abstossungsreaktion zu entwickeln. Diese Abstossungsreaktion wird weiter verstärkt, falls die transplantierten Organe von einem Spender stammen, der selbst Träger eines 825T-Allels ist. Dies erklärt sich damit, daß Organe und Gewebe solcher Spender auf die gesteigerte immunologische Attacke durch Zellen des Empfängers bei Vorhandensein eines 825T-Allels verstärkt reagieren. Ferner findet sich eine verstärkte Reaktion bei akuten oder chronischen Virusinfektionen.

#### 7. Vorhersage einer verstärkten Progression von AIDS

Die Vermehrung des HIV-Virus in T-Lymphozyten wird durch eine Aktivierung von Chemokinrezeptoren, deren Wirkung über die Aktivierung von G-Proteinen vermittelt wird, gesteigert (Kinter, A., Catanzaro, A., Monaco, J., Ruiz, M., Justement, J., Moir, S., Arthos, J., Oliva, A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Ostrowski, M., Hoxie, J., Offord, R., and Fauci, A.S. CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95(20):11880-11885, 1998).

Damit ist zu erwarten, daß in T-Lymphozyten von 825T-Allelträgern, die eine gesteigerte Aktivierbarkeit von G-Proteinen aufweisen, nach HIV-Infektion eine verstärkte Virusvermehrung stattfindet. Somit haben diese Patienten ein erhöhtes Risiko, nach HIV-Infektion früher an AIDS zu erkranken.

als HIV-positive Patienten, die homozygot für das C825-Allel am GNB3-Locus sind. Nachfolgend ist die Genotypverteilung von 515 HIV-positiven Patienten und von 622 HIV-negativen Blutspendern dargestellt.

	HIV positiv	HIV negativ
TT	64	56
TC	235	276
CC	216	290
Summe	515	622
T-Allelfrequenz	35,2 %	31,2 %

Es findet sich ein signifikanter Unterschied der Genotypverteilung zwischen gesunden Kontrollprobanden und HIV-positiven Personen (chi quadrat = 4.253, 1 Freiheitsgrad,  $p = 0.0392$ ; chi-square test for trend). Das Risiko für den TT-versus den CC-Genotyp, HIV-positiv zu sein beträgt damit 1,5 (1,0 - 2,3;  $p = 0.035$ ; chi Quadrat = 4.4).

Es findet sich eine weitere Akkumulation des 825T-Allels innerhalb der Gruppe von HIV-positiven Patienten die an AIDS erkrankt sind, bzw. deren Anzahl CD4-positiver Zellen unter 200 pro  $\mu\text{l}$  Blut abgesunken ist.

	HIV positiv, CD4 < 200 Zellen/ $\mu\text{l}$ Blut	HIV positiv, CD4 $\geq$ 200 Zellen / $\mu\text{l}$ Blut
TT	40	14
TC	122	89
CC	113	80
Summe	275	183
T-Allelfrequenz	36,7 %	32 %

Damit besteht bei HIV-positiven Patienten, die ein 825T-Allel tragen, ein erhöhtes Risiko, an AIDS zu erkranken. Für homozygote 825T-Allelträger ist das Risiko gegenüber homozygoten C825-Allelträgern 2-fach erhöht (OR TT/CC = 2,0 (1,0 - 3,9;  $p < 0,05$ )).

Eine Genotypisierung am GNB3-Locus bietet also die Möglichkeit, daß HIV-positiven 825T-Allelträgern ein erhöhtes Risiko zugeordnet wird, eine verstärkte Progression der Erkrankung zu zeigen, wobei es insbesondere zu einer verstärkten Vermehrung des AIDS-Virus kommt. Ferner ist das Risiko eines schnelleren Absinkens der CD4-Zellen damit verbunden.

Im Rahmen der Infektion mit dem HIV-Virus (sexueller Übertragungsweg) kommt es zumeist zunächst zum Befall von Makrophagen, Monozyten und Langerhanszellen. Die sogenannten "M-tropen" "R5" HIV-Viren benutzen zum Eintritt in diese Zellen u.a. einen Chemokinrezeptor vom Typ CCR5. Individuen, bei denen eine homozygote CCR5 $\Delta$ 32-Deletion nachzuweisen ist, haben ein vermindertes Risiko für eine HIV-Infektion. Personen, bei denen das CCR5 $\Delta$ 32-Allel in heterozygoter Form vorliegt, zeigen einen verlängerten Zeitraum von der HIV-Infektion bis zur Serokonversion, bzw. eine verzögerte Progression der Erkrankung. (1. Quillent, C., Oberlin, E., Braun, J., Rousset, D., Gonzalez-Canali, G., Metais, P., Montagnier, L., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Beretta, A. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene . *Lancet* 351(9095):14-18, 1998; 2. Mummidi, S., Ahuja, S.S., Gonzalez, E., Anderson, S.A., Santiago, E.N., Stephan, K.T., Craig, F.E., O'Connell, P., Tryon, V., Clark, R.A., Dolan, M.J., and Ahuja, S.K. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat.Med.* 4(7):786-793, 1998; 3. Magierowska, M., Theodorou, I., Debre, P., Sanson, F., Autran, B., Riviere, Y., Charron, D., and Costagliola, D. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1- infected individuals. *Blood* 93(3):936-941, 1999; 4. Michael, N.L., Louie, L.G., Rohrbaugh, A.L., Schultz, K.A., Dayhoff, D.E., Wang, C.E., and Sheppard, H.W. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression [see comments]. *Nat.Med.*

3(10):1160-1162, 1997; 5. Fauci, A.S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384:529-534, 1996.)

Im Gegensatz dazu verstärkt die Gegenwart einer Variante im CCR5-Promoter (CCR5P1) die AIDS-Progression, insbesondere bei homozygoten CCR5P1-Trägern. (Martin, M.P., Dean, M., Smith, M.W., Winkler, C., Gerrard, B., Michael, N.L., Lee, B., Doms, R.W., Margolick, J., Buchbinder, S., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Hilgartner, M.W., Vlahov, D., O'Brien, S.J., and Carrington, M. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* 282(5395):1907-1911, 1998.)

Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu Veränderung der Virusart in der Weise, daß die sogenannten "T-tropen" (X4)-Viren überwiegen, welche dann vorwiegend CD4-positive T-Lymphozyten befallen. Der Eintritt dieser Viren erfolgt über den G-Protein-gekoppelten CXCR4 - Chemokinrezeptor, zu dessen natürlichen Liganden u.a. Stromal Cell Derived Factor 1 alpha (SDF-1 $\alpha$ ) gehört. Eine Reihe von Chemokinen (SDF-1 $\alpha$ , RANTES, etc.) stimulieren die Vermehrung von T-tropen Viren in CD4-positiven T-Zellen, wobei der Signalübertragung über Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen eine entscheidende Bedeutung zukommt: Eine Hemmung der G-Proteinaktivierung durch Inkubation von Zellen mit Pertussistoxin reduziert die Virusvermehrung insbesondere bei niedriger Viruszahl. (Kinter, A., Catanzaro, A., Monaco, J., Ruiz, M., Justement, J., Moir, S., Arthos, J., Oliva, A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Ostrowski, M., Hoxie, J., Offord, R., and Fauci, A.S. CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction.

*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95(20):11880-11885, 1998.)

Umgekehrt läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß bei Vorliegen eines 825T-Allels, welches die Expression von G $\beta$ 3-s und G $\beta$ 3-s2 und eine verstärkte Aktivierbarkeit von G-Proteinen anzeigt, die Vermehrung solcher Viren und damit die AIDS - Progression gesteigert sein sollten.

Eine Veränderung im Gen, welches für SDF-1 kodiert (G→A - Transition bei Position 801, gezählt vom Startkodon) wird als SDF1-3'UTR-801G-A oder als SDF1-3'A bezeichnet. Homozygote SDF1-3'A zeigen eine verminderte Progression zu AIDS. (Winkler, C., Modi, W., Smith, M.W., Nelson, G.W., Wu, X., Carrington, M., Dean, M., Honjo, T., Tashiro, K., Yabe, D., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Jacobson, L.P., Detels, R., Donfield, S., Willoughby, A., Gomperts, E., Vlahov, D., Phair, J., and O'Brien, S.J. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC) [see comments]. *Science* 279(5349):389-393, 1998.)

Zum Nachweis einer verstärkten AIDS-Progression von 825T-Allelträgern wurden 690 HIV-positive, homo- und heterosexuelle Personen (Männer und Frauen) untersucht, bei den das HIV-Virus auf sexuellem Wege übertragen wurde. Nach Genotypisierung wurden die folgenden Endpunkte der Erkrankung festgelegt, die eine mögliche Definition der Erkrankung an AIDS darstellen:

1. AIDS. Hierbei ist AIDS definiert als AIDS- definierende Erkrankung oder CD4 -Zellzahl < 200. Diese AIDS - Definition entspricht der 1993 vom Center for Disease Control (CDC; Atlanta, USA) revidierten AIDS- Definition.
2. CD4 - Zellzahl < 200
3. Minimale CD4-Zellzahl
4. Maximale Viruslast

In Fig. 9 ist der Zeitpunkt vom ersten positiven HIV-Test bis zur AIDS- Diagnose als Kaplan- Meier- Kurven in Abhängigkeit vom Genotyp dargestellt. Fig. 9 zeigt, daß homozygote 825T-Allelträger den Endpunkt AIDS gemäß der CDC - Definition von 1993 signifikant früher erreichen, als homozygote oder heterozygote 825C-Allelträger.



Fig. 10 zeigt den Zeitraum zwischen erstem positiven HIV - Test und Absinken der CD4-Zellzahl unter 200. Hier ist der Zeitverlauf für homozygote 825T-Allelträger gegenüber homo- und heterozygoten C825-Allelträgern ebenfalls drastisch beschleunigt.

Fig. 11 zeigt den Zeitverlauf von erstem positivem HIV - Test und individuell niedrigster CD4-Zellzahl. Hier ergibt sich ebenfalls eine signifikante Beschleunigung bei homozygoten 825T-Allelträgern gegenüber homo- und heterozygoten C825-Allelträgern.

In Fig. 12 ist der Zeitraum zwischen erstem positiven HIV-Test und maximaler Viruslast dargestellt. Wiederum zeigt sich, daß 825T-Allelträger ein deutlich erhöhtes Risiko aufweisen, früher eine maximale Viruslast aufzuweisen als homo- oder heterozygote C825-Allelträger.

#### 7.1 Korrelation zum CCR5-Allelstatus

Nachfolgend wurde zusätzlich der CCR5-Allelstatus bezüglich des Vorhandenseins der  $\Delta 32$ -Deletion untersucht. Die in der nachfolgenden Tabelle dargestellten relativen Risiken (RH) werden zusammen mit den 95 % Konfidenzintervallen (95 % CI) dargestellt.

Ohne Beachtung des genetischen Hintergrunds ist das Risiko für AIDS oder Absinken der CD4-Zellzahl  $< 200$  für homozygote 825T-Allelträger gegenüber homo- und heterozygoten C825-Allelträgern etwa verdoppelt. Ohne Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes findet man ein 1,4-fach erhöhtes Risiko für CCR5  $\Delta 32$  -Allelträger im Beobachtungszeitraum eine CD4-Zellzahl  $< 200$  zu erreichen. Nachfolgend wird der Einfluß des 825T-Allels für CCR5-Wildtyp und für CCR5 $\Delta 32$  getrennt untersucht. Bei Vorhandensein des homozygotem CCR5-Wildtyp beträgt das Risiko für AIDS oder CD4-Zellzahl  $< 200$  für homozygote 825T-Allelträger gegenüber heterozygoten C825-Allelträgern etwa 1,6.

Bei Vorhandensein des CCR5 $\Delta$ 32 Genotyps, welcher ursprünglich als protektiv beschrieben wurde, findet man jedoch für homozygote 825T-Allelträger eine weitere Erhöhung des Risikos auf nahezu das 3-fache gegenüber heterozygoten C825-Allelträgern.

Tabelle :

GNB3 825 Genotypstatus und CCR5 -Genotypstatus und AIDS-Progression

COX Proportional Hazard Modell:

Konstant	Zielgröße	Genstatus untersucht	RH	95% CI
nichts	AIDS	GNB3 TT versus TC+CC	1.9	(1.4-2.6)
	CD4 < 200	"	1.9	(1.4-2.6)
	CD4 min	"	1.5	(1.2-2.0)
	PCR max	"	1.5	(1.2-2.0)
nichts	AIDS	CCR5 WT versus CCR5 $\Delta$ 32	ns	
	CD4 < 200	"	1.4	(1.0-1.9)
	CD4 min	"	ns	
	PCR max	"	ns	
CCR 5 = WT	AIDS	GNB3 TT versus TC+CC	1.6	(1.1-2.3)
	CD4 < 200	"	1.6	(1.1-2.3)
	CD4 min	"	1.4	(1.1-1.9)
	PCR max	"	1.4	(1.0-1.9)
CCR5 $\Delta$ 32	AIDS	GNB3 TT versus TC + CC	2.7	(1.3 ~ 5.5)
	CD4 < 200	"	3.0	(1.5-6.3)
	CD4 min	"	2.1	(1.1-3.8)
	PCR max	"	1.9	(1.0-3.4)

RH = relative hazard; 95% CI = 95 % Konfidenzintervall; GNB3 = G-Protein  $\beta$ 3-Untereinheit; TT = Homozygot für 825T; TC und CC, hetero- oder homozygot für C825; CCR5 WT = CCR5-Wildtyp (Fehlen der  $\Delta$ 32-Deletion); PCR-max, Zeitraum bis zur maximalen Viruslast; AIDS, Zeitraum bis zum Eintritt von AIDS gemäß CDC-Definitio von 1993; ns = nicht signifikant

Es läßt sich daher zusammenfassend für HIV-positive Patienten feststellen:

1. Homozygotie für das 825T-Allel in GNB3 erhöht das Risiko für die Progression zu AIDS.
2. Dieser Effekt wird bei Vorliegen des CCR5 $\Delta$ 32-Genotyps weiter verstärkt.

## 8. Vorhersage einer erhöhten CO<sub>2</sub>- bzw. Hypoxietoleranz

Bekanntlich sind G-Proteine auch an der Regulation des Atemantriebs durch Hypoxie bzw. Hyperkapnie beteiligt (Prabhakar, N.R., Kou, Y.R., and Kumar, G.K. G proteins in carotid body chemoreception. Biol.Signals 4:271-276, 1995; Cachero, T.G., Rocher, A., Rigual, R.J., and Gonzalez, C. Effects of fluoride and cholera and pertussis toxins on sensory transduction in the carotid body. Am.J.Physiol.Cell Physiol. 269:C1271-C1279, 1995).

Es hat sich herausgestellt, daß Probanden, die das GNB3-825T-Allel tragen, einen verminderten Antrieb der Atmung (Atemminutenvolumen) bei Erhöhung des inspiratorischen pCO<sub>2</sub> und damit eine gesteigerte CO<sub>2</sub>-Toleranz zeigen. Eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Toleranz stellt insbesondere für solche Personen ein erhöhtes Risiko dar, in deren Arbeitsumgebung es zu einer CO<sub>2</sub>-Akkumulation kommen kann. Die verminderte CO<sub>2</sub>-Sensitivität beinhaltet dabei ein erhöhtes Risiko für eine spontan auftretende Bewußtlosigkeit, z.B. im Rahmen des narkotischen Effekts von CO<sub>2</sub>. Betroffen hiervon sind z.B. Berufstaucher, Tunnelarbeiter, Piloten, U- Boot-Fahrer usw. Mit dem Nachweis des GNB3-825T-Allels können solche Personen identifiziert und gewarnt werden, so daß das Unfallrisiko vermindert wird.

## 9. Vorhersage von Osteoporose

Eine generalisierte Osteoporose stellt eine der häufigsten Erkrankungen von Frauen nach der Menopause dar und beinhaltet ein erhöhtes Risiko für Knochenfrakturen. G-Proteine sind an Prozessen, die zum Umbau des Knochens führen, maßgeblich beteiligt. Eine veränderte Aktivierbarkeit von G- Proteinen ist damit erheblich am Erkrankungsrisiko für Osteoporose beteiligt (May, L.G. and Gay, C.V. Multiple G-protein involvement in parathyroid hormone regulation of acid production by osteoclasts. J.Cell Biochem. 64(1):161-170, 1997; Gordeladze, J.O., Lund, H.W., Jablonski, G., and Bruland, O.S. Diverse

expression of G-proteins in human sarcoma cell lines with different osteogenic potential: Evidence for the involvement of  $G_{i2}$  in cell proliferation. J.Cell.Biochem. 60:95-106, 1996).

Auch in diesem Fall zeigen Trägerinnen des GNB3-825T-Allels ein erhöhtes Risiko, an Osteoporose zu erkranken.

#### 10. Vorhersage von Morbus Alzheimer

Eine geänderte Aktivierbarkeit von G-Proteinen und eine veränderte Regulation von  $K^+$ -Kanälen wurde bei Patienten mit Morbus Alzheimer beschrieben. Ferner wurde eine verminderte Aktivierung der Adenylylcyclase nach Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren beschrieben. Diese Phänomene können auf eine erhöhte Aktivierbarkeit Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine mit Expression der  $G\beta 3s$ -Spleißvariante zurückgeführt werden (Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., and Nishimoto, I. Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. J.Biol.Chem. 270:4205-4208, 1995; Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Murayama, Y., and Ogata, E. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein  $G_0$ . Nature 362:75-79, 1993; Etcheberrigaray, R., Ito, E., Oka, K., Tofel-Grehl, B., Gibson, G.E., and Alkon, D.L. Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8209-8213, 1993; Yamatsuji, T., Matsui, T., Okamoto, T., Komatsuzaki, K., Zakeda, S., Fukumoto, H., Iwatsubo, T., Suzuki, N., Asami-Odaka, A., Ireland, S., Kinane, T.B., Giambarella, U., and Nishimoto, I. G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. Science 272:1349-1352, 1996; Cowburn, R.F., Wiehager, B., Ravid, R., and Winblad, B. Acetylcholine muscarinic M2 receptor stimulated [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding shows regional selective changes in Alzheimer's disease postmortem brain. Neurodegeneration 5:19-26, 1996).

Demzufolge weisen Träger des GNB3-825T-Allels ein erhöhtes Risiko auf, an Morbus Alzheimer zu erkranken. Zudem trägt die bei Trägern des GNB3-825T-Allels zu beobachtende früh einsetzende unter 3. beschriebene Atherosklerose zur Entstehung des Morbus Alzheimer bei.

#### 11. Vorhersage einer erektilen Dysfunktion (Impotenz)

Die Erektion des Penis nach sexueller Stimulation wird durch einen gesteigerten Blutzufuß bei gleichzeitig vermindertem Blutabfluß hervorgerufen. Die für den gesteigerten Blutzufuß erforderlichen Mechanismen umfassen die Wirkungen von Hormonen, deren Wirkung über G-Proteine vermittelt wird.

Es wurden 63 Männer mit nachgewiesener erektiler Dysfunktion und 614 gesunde, männliche Kontrollen am GNB3 825-Locus genotypisiert:

	Erektile Dysfunktion	Kontrollmänner
TT	2 (3)	55 (9)
TC	20 (32)	275 (45)
CC	41 (65)	284 (46)
Summe	63	614
FT (%)	19,0 %	31,4 %

Die Zahlen sind n (%)

Die Verteilung der Genotypen ist signifikant verschieden (chi-Quadrat = 8,7; 2 Freiheitsgrade,  $p = 0,01$ ), wobei bei den Männern mit erektiler Dysfunktion eine drastische Reduktion der Frequenz des 825T-Allels auf 19 % auffällt. Hierdurch lassen sich für die erektile Dysfunktion im Vergleich zu einer randomisierten Kontrollgruppe die folgenden Risiken (odds ratios; OR) errechnen:

CC/TT, OR = 4,0 (95 % CI: 0,9 - 16,9; p = 0,04)

CC/TC, OR = 2,0 (95 % CI: 1,1 - 3,5; p = 0,01).

Damit haben homozygote C825-Allelträger gegenüber homozygoten 825T-Allelträgern ein 4-fach erhöhtes Risiko, gegenüber heterozygoten 825T-Allelträgern ein verdoppeltes Risiko, an einer erektilen Dysfunktion (Impotenz) zu erkranken. Ferner ist das Risiko für heterozygote 825T-Allelträger gegenüber homozygoten 825T-Allelträgern etwa verdoppelt.

## 12. Vorhersage von Schilddrüsenfunktionsstörungen

Träger des 825T-Allels weisen häufig eine gestörte Schilddrüsenfunktion auf und müssen mit Schilddrüsenhormonen (z. B. Thyroxin) behandelt werden.

## 13. Vorhersage eines erhöhten Schwangerschaftsrisikos

Hochdruck, Ödembildung und das sog. „HELLP-Syndrom“ bedeuten eine schwerwiegende Gefahr für die Schwangerschaft, sowohl für das Leben der Mutter als auch für das Leben des ungeborenen Kindes. Es wurde gefunden, daß bei Trägerinnen des 825T-Allels, die einen Schwangerschaftshochdruck entwickeln (Gestose, Präeklampsie) ein hohes Risiko für eine Frühgeburt (Geburt vor der 37. Schwangerschaftswoche oder Geburtsgewicht des Kindes kleiner als 2500g, siehe auch 14.) besteht, wobei für diese Kinder zusätzlich das Risiko für eine Totgeburt oder für einen Tod nach der Entbindung besteht. Gleichzeitig erhöht sich bei Frauen, die Trägerinnen des 825T-Allels sind und unter Schwangerschaftsgestose leiden, das Risiko für spontane Aborte (habituelle Aborte).

Der Nachweis eines 825T-Allels ist daher geeignet, ein erhöhtes Todesrisiko für das ungeborene Kind von Schwangeren mit Schwangerschaftsgestose vorherzusagen.

#### 14. Vorhersage eines niedrigen Geburtsgewichts

Bekannterweise besteht ein empirischer Zusammenhang, der eine inverse Relation zwischen Geburtsgewicht und dem Risiko beschreibt, im Laufe des Lebens an Übergewicht, Hypertonie, oder Typ-2- Diabetes zu erkranken. Hierbei wurde beschrieben, daß Individuen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht besonders zu diesen Erkrankungen neigen. Es wurde deshalb untersucht, ob für Kinder mit 825T-Allel ein erhöhtes Risiko besteht, mit niedrigem Geburtsgewicht auf die Welt zu kommen. Als niedriges Geburtsgewicht wurde dabei dasjenige Gewicht definiert, das sich nach Aufteilung aller Gewichte im niedrigsten Quartil der gesamten Verteilung befindet. Vergleicht man die Verteilung der Genotypen am GNB3-Locus zwischen dem 1. Quartil mit den zusammengefaßten Quartilen 2 - 4 so zeigt sich für homozygote 825T-Allelträger gegenüber homozygoten C825-Allelträgern ein 6-fach erhöhtes Risiko (95% CI = 1,3 - 28,6;  $p < 0.05$ ) für niedriges Geburtsgewicht (Quartil 1 versus Quartile 2-4) und für heterozygote 825T-Allelträger ein 2,4-fach erhöhtes Risiko (95 % CI = 0,7 - 7,9).

#### G β3 Gen 825T - Allel und Geburtsgewicht

	1. Quartil	2. Quartil	3. Quartil	4. Quartil	2.-4.Quar- til
Geburts- gewicht	-3130 g	-3430 g	-3750 g	> 3750 g	Alle > 3130 g
TT	5	1	2	2	5
TC	11	9	11	7	27
CC	5	11	8	11	30
Summe	21	21	21	20	62
% T	50	26	36	27,5	30

Nach einer Genotypisierung am GNB3-Locus wird also Trägern eines 825T-Allels ein erhöhtes Risiko zugeordnet, mit niedrigem

Geburtsgewicht geboren zu werden und einer intrauterinen Wachstumsretardierung zu unterliegen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Pharmakogenetik des GNB3-825T-Allels, d.h. die Möglichkeit, anhand des Genotyps die Wirkung von Pharmaka vorherzusagen.

Die meisten Pharmaka (Hormone, Rezeptoragonisten) üben ihre Wirkung über Rezeptoren aus, die an G-Proteine koppeln. Antagonisten blockieren die Hormon- Rezeptor- Interaktion.

Es hat sich nun herausgestellt, daß die Genotypisierung am GNB3-Locus dazu geeignet ist, die Wirksamkeit von Pharmaka anhand des Genotyps vorherzusagen. Dies betrifft die Ansprechbarkeit in vivo auf Hormone, Transmitter (auch Neurotransmitter) oder Pharmaka, die solche G-Protein-Heterotrimere aktivieren, welche die G-Protein-Untereinheiten G $\beta$ 3 und G $\beta$ 3s beinhalten. Damit einher geht die Vorhersage einer verminderten Wirksamkeit von Hormonen, Neurotransmittern oder Pharmaka, welche die G-Protein-Untereinheit G $\alpha$ S stimulieren, z.B.  $\beta$ -adrenerge Agonisten. Dies gilt auch bei gleichzeitiger Verwendung des Nachweises der Arg16Gly-Variante und der Gln27Glu-Variante im  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor. Das Vorhandensein des GNB3-825T-Allels zeigt also eine veränderte Pharmakogenetik an und sollte bei der spezifischen Auswahl einer Therapieform (pharmakologisch oder nicht- pharmakologisch ) und bei der Dosierung von Pharmaka oder Hormonen bei Hypertonie, Diabetes mellitus, koronarer Herzkrankheit, akutem Myokardinfarkt mit oder ohne Herzrhythmusstörungen, Herzrhythmusstörungen, Transplantatabstossung etc. berücksichtigt werden.

Im diesem Zusammenhang erlaubt das Vorhandensein des GNB3-825T-Allels aber auch die Vorhersage der Wirksamkeit der Gabe von Erythropoetin auf die Blutbildung und Vorhersage der Entstehung einer Hypertonie unter dieser Therapie sowie die Vorhersage der



Gefahr, unter immunsuppressiver Therapie (z.B. mit Cyclosporin) eine Hypertonie zu entwickeln.

Ebenfalls in diesem Zusammenhang kann die Wirksamkeit von Substanzen zu Therapie und Prophylaxe des Migräneanfalls (Agonisten am Serotonin-Rezeptor) vorhergesagt werden.

Dies wird anhand des folgenden Beispiels demonstriert. Hierbei wurde bei Probanden intrakoronar ein  $\alpha 2$ -adrenerger Agonist (BHT 933) appliziert, der zur Kontraktion von Koronargefäßen führt. Dieser Effekt wurde über die Flußänderung durch diese Gefäßabschnitte quantifiziert. Wie Fig. 8 zeigt, beobachtet man eine verstärkte Abnahme der Koronardurchblutung bei Trägern des GNB3-825T-Allels, unabhängig davon, ob sie an einer koronaren Herzkrankheit (KHK) erkrankt sind. Das heißt, daß bei Trägern des GNB3-825T-Allels eine Verstärkung der Wirkung solcher Pharmaka vorauszusagen ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Herstellung von Pharmaka, welche die G $\beta$ 3s - Spleißvariante hemmen.

Prinzipiell ist es möglich, Chemikalien zu synthetisieren, welche die Funktion des G $\beta$ 3s - Proteins hemmen, indem diese z.B. zu einem beschleunigten Abbau des Proteins führen, oder seine Interaktion und Kombination mit  $\alpha$ - und  $\gamma$ - Untereinheiten des humanen G-Proteins hemmen. Zur Identifizierung solcher Substanzen ist ein Screeningsystem erforderlich. Hierzu eignet sich die Expression der G $\beta$ 3s-Untereinheit alleine oder in Kombination mit unterschiedlichen G $\alpha$ - und G $\gamma$ -Untereinheiten in Sf9-Insektenzellen, in anderen zur Transfektion geeigneten Zellen, oder die Verwendung gereinigter G $\alpha$ - und G $\gamma$ 3s - Untereinheiten in einem Rekonstitutionssystem in Ab- oder Anwesenheit eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Mittels solcher Systeme läßt sich z.B. die Wirkung von Chemikalien auf die Rezeptor- vermittelte Bindung von GTP an die G $\alpha$ -

Untereinheit untersuchen, wodurch letztendlich Chemikalien identifiziert werden können, welche die Funktion der G $\beta$ 3s-Untereinheit hemmen. Ein solches Testsystem kann prinzipiell auch als "High-Throughput-Screening-System" zur Testung einer Vielzahl von Substanzen eingesetzt werden.

### **Zweite Spleißvariante des G $\beta$ 3s-Proteins (G $\beta$ 3s-2)**

Durch weitere Analysen des GNB3 Gens wurde eine weitere Spleißvariante der G $\beta$ 3s-Untereinheit heterotrimerer G-Proteine des Menschen gefunden, die mit G $\beta$ 3s-2 bezeichnet wird.

Hierzu wurde aus neutrophilen Granulozyten von Menschen die homozygot für das C825 in GNB3 sind (CC-Genotyp), oder die heterozygot für den C825T - Polymorphismus sind (TC-Genotyp) die mRNA mittels Standardmethoden extrahiert und mittels der reversen Transkriptasereaktion in cDNA umgeschrieben. Die cDNA, die für G $\beta$ 3 kodiert wurde mittels einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Dabei kamen die folgenden Primer zum Einsatz:

Sense: 5' - gcc gtc aga ctt tca ctg gc - 3'

Antisense: 5'-tgt tca ctg cct tcc act tcc - 3'

Die Lokalisation dieser Primer ist so gewählt, daß ein Primer im Bereich von Exon 9 des Gens liegt, während der andere Primer in Exon 11 im 3'-nicht-translatierten Bereich liegt.

Die folgenden PCR-Bedingungen wurden eingesetzt:

5 min.: 94 °C - 1 min., 60 °C - 45 sek., 72 °C - 1 min.;  
abschließend: 72 °C - 7 min.

Die PCR-Produkte wurden im 2,5 % Agarose-Gel in 0,5 x TBE plus 0,1  $\mu$ m/ml Ethidiumbromid aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert. Als Größenmarker wurde pBR322 DNA/Alu I eingesetzt.

Wie in Fig. 13 ersichtlich wird, detektiert man in Zellen von Personen, die an Position 825 der cDNA ein T-Allel tragen (heterozygot oder homozygot) ein weiteres spezifisches, verkürztes RT-PCR-Produkt.

Es wurde gefunden, daß das verkürzte PCR-Produkt eine neue Spleißvariante des G $\beta$ 3-Gens repräsentiert. Eine Darstellung dazu findet sich in Anlage 3. Gezeigt wird die komplette Sequenz der cDNA, wie sie früher von Levine et al. beschrieben wurde (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T., Jr., Helman, L.J., and Ahn, T.G. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87(6):2329-2333, 1990). Hierbei wird die ursprünglich von diesen Autoren vorgegebene Numerierung beibehalten, so daß das Startkodon ATG der Position 6 der Nukleinsequenz zugeordnet wird.

Dargestellt ist die bereits früher beschriebene Deletion der Nukleotide 504 - 626 (entsprechend 498 - 620 falls die Numerierung mit dem Startkodon ATG beginnt), die durch alternatives Spleißen des Gens bei Trägern eines 825T-Allels bewirkt wird. In Anlage 3 wird dieser Bereich mit "Deletion in G $\beta$ 3s" bezeichnet (Siffert, W., Rosskopf, D., Siffert, G.,

Horsthemke, B. Association of the human G-protein beta3 subunit variant with hypertension Nat.Genet. 18(1):45-48, 1998). Die jetzt neu beschriebene Deletion tritt in Exon 10 des Gens auf, schließt den früher beschriebenen C825T-Polymorphismus mit ein und umfaßt 129 Nukleotide, was auf Proteinebene einem Verlust von 43 Aminosäuren entspricht (in Anlage 3 mit "Deletion in G $\beta$ 3s-2" bezeichnet). Der offene Leserahmen bleibt dabei erhalten. Die genaue Lage der Deletion läßt sich wegen repetitiver Sequenzen nicht eindeutig feststellen. Es können die Nukleotide 708 - 836 oder die Nukleotide 712 - 840 wegfallen. Legt man das ATG des Startkodons mit 1 fest, so entfallen die Nukleotide 702 - 830 bzw. 706 - 834. Die Kenntnis der genauen Lage dieser Deletion ist für die neue cDNA- und

Aminosäuresequenzen von G $\beta$ 3s-2 unerheblich. In Anlage 3 sind ferner die Polymorphismusstellen C825T und C1423T dargestellt. Wegen der Verwendung der ursprünglichen Numerierung nach Levine et al. in Anlage 3 findet sich der C825T-Polymorphismus an Position 831 und der C1423T-Polymorphismus an Position 1249. Durch weiteres Sequenzieren wurde ein neuer T657A-Polymorphismus gefunden, der bei ca. 1-3 % aller Kaukasier auftritt.

Die neue cDNA-Sequenz von G $\beta$ 3s-2 ist in Anlage 4 gemeinsam mit der Aminosäuresequenz kombiniert dargestellt.

G-Protein  $\beta$ -Untereinheiten gehören zur Familie der WD-repeat-Proteine. Solche  $\beta$ -Untereinheiten sind hoch konserviert. Bekannt ist die Tatsache, daß solche  $\beta$ -Untereinheiten eine räumliche Struktur ausbilden, die der eines Propellers mit sieben Propellerblättern ähnelt (Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D.C., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. Crystal structure of a G protein  $\beta\gamma$  dimer at 2.1Å resolution. Nature 379:369-374, 1996). Aufgrund der in G $\beta$ 3s-2 auftretenden Deletion läßt sich vorhersagen, daß eine neue  $\beta$ -Untereinheit entsteht, welche, analog zu G $\beta$ 3-s, nur sechs anstatt sieben solcher Rotorblätter aufweist. Dies ist in Fig. 14 schematisch dargestellt, wobei gleichzeitig die früher in G $\beta$ 3-s gefundene Deletion gezeigt ist.

Zunächst wurde untersucht, ob G-Protein-Heterotrimere, welche G $\beta$ 3s-2 beinhalten funktionell aktiv sind. Dazu wurde, wie früher beschrieben, das Sf9-Insektionzellsystem eingesetzt (Siffert, W. Roskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., and Horsthemke, B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. Nat.Genet. 18(1):45-48, 1998). Die Zellen wurden mit G $\alpha$ i2, G $\gamma$ 12 und dem m2-muskarinergen Acetylcholinrezeptor transfiziert. Die Bindung

von 35S-GTPyS an permeabilisierte Zellen wurde nach Stimulation mit Carbachol (100µM) quantifiziert. Hierbei ist der spezifische Einbau von 35S-GTPyS ein Maß für die Aktivierung von G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten. Wie in Fig. 15 dargestellt beobachtet man in Abwesenheit einer  $\beta$ -Untereinheit nur eine geringe G-Proteinaktivierung. Nach Transfektion von G $\beta$ 3 oder G $\beta$ 3s wird die G-Proteinaktivierung deutlich verstärkt, wobei G $\beta$ 3s potenter als G $\beta$ 3 ist. Die neue Splicevariante G $\beta$ 3s-2 führt zur stärksten Potenzierung der durch den Agonisten Carbachol hervorgerufenen G-Proteinaktivierung. Damit wird gleichzeitig gezeigt, daß G $\beta$ 3s-2 trotz der Deletion eines Propellerblatts funktionell aktiv ist und sogar zu einer verstärkten Aktivierung von G-Proteinen führt. Damit werden auch frühere Befunde erklärt, die eine verstärkte Aktivierbarkeit von G-Proteinen in Zellen von Personen nachgewiesen haben, welche ein 825T-Allel tragen (Siffert, W., Roszkopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H. and Horsthemke, B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat.Genet.* 18(1):45-48, 1998. Pietruck, F., Moritz, A., Montemurro, M. Sell, A., Busch, S., Roszkopf, D., Virchow, S., Esche, H., Brockmeyer, N., Jakobs, K.H., and Siffert, W. Selectively enhanced cellular signalling by G $_i$  proteins in essential hypertension. G $\alpha_{i2}$ , G $\alpha_{i3}$ , G $\beta_1$  and G $\beta_2$  are not mutated. *Circ.Res.* 79:974-983, 1996. Siffert, W., Roszkopf, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg-Stasch, S., Kettler, N., Hartung, K., Bechmann, S., and Jakobs, K.H. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J.Clin.Invest.* 96:759-766, 1995. Virchow, S., Ansorge, N., Rübber, H., Wiffert, G., and Siffert, W. Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying out the G protein beta3 subunit 825 T-allele. *FEBS Lett.* 436(2):155-158, 1998).

Es ist allgemein bekannt, daß  $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine unterschiedliche Isoformen der Phospholipase C $\beta$

stimulieren können. Dieses Enzym spaltet Phospholipide, z.B. Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphat zu den "second messenger"-Molekülen Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG), IP3 bewirkt die Freisetzung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern, während DAG unterschiedliche Isoformen der Proteinkinase C aktivieren. Die Aktivierung von Phospholipase C ist damit ein wesentlicher Schritt in der Zellaktivierung. Es wurde untersucht, ob  $\beta\gamma$ -Untereinheiten, welche G $\beta$ 3s-2 beinhalten, die Phospholipase C $\beta$ 3 (PLC $\beta$ 3) aktivieren können. Dazu wurde das COS-7 Zellsystem eingesetzt, welches in der allgemein zugänglichen Literatur häufig für die transiente Transfektion von Proteinen Verwendung findet. Diese Zellen wurden mit der PLC $\beta$ 3, G $\gamma$ 12 und unterschiedlichen G $\beta$ -Untereinheiten transfiziert. Die Zellen wurden mit radioaktiv markierten [3H]-Inositol vorbehandelt. Die Bildung von Inositolphosphaten (IP) wurde nach Standardverfahren quantifiziert, wobei die Menge der gebildeten IP ein Maß für die Aktivierung der PLC darstellt. Wie in Fig. 16 dargestellt, können  $\beta\gamma$ -Dimere die G $\beta$ 3, G $\beta$ 3s oder G $\beta$ 3s-2 enthalten die PLC $\beta$ 3 aktivieren. Zum Vergleich ist ebenfalls die Aktivierung der PLC $\beta$ 3 nach Transfektion von G $\beta$ 1 gezeigt.

Diese Untersuchungen belegen, daß G $\beta$ 3s-2 in der Lage ist, die Stimulation typischer zellulärer Effektorsysteme zu bewirken. Es handelt sich somit um ein voll funktionsfähiges Protein, wobei Personen, die ein 825T-Allel tragen und dieses Protein exprimieren, eine verstärkte zelluläre Aktivierbarkeit zuzuordnen ist.

Die aufgefundene Spleißvariante G $\beta$ 3s-2 läßt sich dadurch vorteilhaft nutzen, daß entsprechende Proteine hergestellt werden mit dem Ziel, Chemikalien zu entwickeln oder zu testen, die das Protein hemmen oder seine Interaktion mit G-Protein  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Untereinheiten verhindern.

Insbesondere im Bereich der Therapie ist es sinnvoll, in Kenntnis der aufgefundenen Splicevariante Zellen oder Gewebe stabil oder transient zu transfizieren. Ebenfalls zu therapeutischen Zwecken kann die G $\beta$ 3s-2 Splicevariante in menschlichen oder tierischen Zellen oder Geweben exprimiert werden.

Eine weitere Verwendung der in Anlage 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz der cDNA besteht darin, Gensonden zum Nachweis dieser Nucleinsäuresequenz zu entwickeln.

Weiterhin kann in Zellen und Geweben eine Antisense-Konstrukte (z.B. Oligonukleotid) eingebracht werden mit dem Ziel, die Synthese der G $\beta$ 3s-2 Splicevariante zu unterdrücken.

Antisense-Konstrukte können auch durch Zuhilfenahme unterschiedlicher Vektoren (z.B. gentechnisch veränderte Viren) in solche Zellen oder Gewebe eingebracht werden.

Patentansprüche

1. Nukleinsäuresequenz codierend für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins mit der in Anlage 1 dargestellten Sequenz.
2. Nukleinsäuresequenz codierend für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins mit der in Anlage 2 dargestellten Sequenz.
3. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanes G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Ermittlung des Risikos, an einer mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheit zu erkranken.
4. Verwendung nach Anspruch 3 zur Ermittlung des Risikos, an Diabetes mellitus Typ 2, Übergewicht und Adipositas, Hypercholesterinämie, koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, plötzlichem Herztod, Osteoporose, Atherosklerose, neurodegenerativen oder cerebrovaskulären Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer, einer Krankheit, die auf einer gesteigerten Reaktionsfähigkeit des Immunsystem beruht und/oder nicht an erektiler Dysfunktion zu erkranken.
5. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Vorhersage des Risikos von Frauen, an einer kardiovaskulären Erkrankung, insbesondere Bluthochdruck oder koronare Herzkrankheit zu erkranken und zur Erstellung einer gezielten Hormontherapie um das kardiovaskuläre Risiko zu vermindern.



6. Verfahren zur Ermittlung des Risikos eines Probanden, an einer mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheit zu erkranken, bei dem die Gensequenz für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins des Probanden mit der Gensequenz in Anlage 1 und/oder Anlage 2 vergleicht und für den Fall, daß sie mit der Gensequenz in Anlage 2 in Position 825 und/oder in Position 1429 übereinstimmt, dem Probanden ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zuordnet.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg), im IRS2-Gen, im Gen, das für die p85 $\alpha$ -regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase kodiert (1020 G  $\rightarrow$  A; Kodon 326 Met  $\rightarrow$  Ile), im Gen, das für den  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptor kodiert (Trp64Arg), im Gen, das für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor kodiert (hier insbesondere die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante), im Gen, das für Tumornekrosefaktor  $\alpha$  kodiert und/oder im Gen, das für Leptin oder den Leptinrezeptor kodiert, untersucht werden.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an Übergewicht und Adipositas zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg), im Gen, das für den  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptor kodiert (Trp64Arg-Variante) und/oder im Gen, das für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor kodiert, (insbesondere die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante) untersucht werden.

9. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an koronarer Herzkrankheit und/oder Myokardinfarkt zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg) untersucht werden.

10. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an Krankheiten, die mit einer gesteigerten Reaktionsfähigkeit des Immunsystems assoziiert sind, zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen, im  $\beta 2$ -adrenergen Rezeptor, (insbesondere die Arg16Gly- Variante und die Gln27Glu-Variante) untersucht werden.

11. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß homozygoten HIV-positiven Probanden ein erhöhtes Risiko zugeordnet wird, an AIDS zu erkranken.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an AIDS zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im CCR5-Gen untersucht werden und daß den homo- oder heterozygoten Probanden für den CCR5 $\Delta$ 32-Polymorphismus ein weiter erhöhtes Risiko zugeordnet wird, an AIDS zu erkranken.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an AIDS zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im CCR5-Gen untersucht werden und daß den Probanden die das CCR5P1-Allel tragen ein weiter erhöhtes Risiko zugeordnet wird, an AIDS zu erkranken.

14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos an AIDS zu erkranken, gleichzeitig bezüglich des SDF1-3'UTR-801G-A Polymorphismus untersucht werden und daß den Probanden, die das SDF1-3'A-Allel tragen ein weiter erhöhtes Risiko zugeordnet wird, an AIDS zu erkranken.

15. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution

von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Identifizierung von Personen mit erhöhter CO<sub>2</sub>- bzw. Hypoxietoleranz.

16. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Vorhersage der Ansprechbarkeit eines Probanden in vivo auf Hormone, Transmitter (auch Neurotransmitter) oder Pharmaka, die solche G-Protein-Heterotrimere aktivieren, welche die G-Protein-Untereinheiten G $\beta$ 3 und G $\beta$ 3s beinhalten und/oder die G-Protein-Untereinheit G $\alpha$ S stimulieren.

17. Verwendung nach Anspruch 16 zur Vorhersage der Ansprechbarkeit eines Probanden, wobei gleichzeitig die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante im  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor nachgewiesen wird.

18. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17 zur spezifischen Auswahl einer pharmakologischen oder nicht-pharmakologisch Therapieform bzw. der Dosierung von Pharmaka oder Hormonen bei Hypertonie, Diabetes mellitus, koronarer Herzkrankheit, akutem Myokardinfarkt mit oder ohne Herzrhythmusstörungen, Herzrhythmusstörungen und Transplantatabstossung.

19. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17, zur Vorhersage der Wirksamkeit der Gabe von Erythropoetin auf die Blutbildung und/oder Vorhersage der Entstehung einer Hypertonie unter dieser Therapie.

20. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17, zur Vorhersage der Gefahr, unter immunsuppressiver Therapie, insbesondere mit Cyclosporin, eine Hypertonie zu entwickeln.

21. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17 zur Vorhersage der Wirksamkeit von Substanzen zu Therapie und Prophylaxe des Migräneanfalls.

22. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die komplementär zu der Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 ist, zur Herstellung eines Antisense-Arzneimittels zur Therapie oder Prävention von Krankheiten.

23. Verwendung des Proteins der G $\beta$ 3s-Untereinheit des humanen G-Proteins in rekombinierten Systemen oder nach Transfektion in geeigneten Zelllinien zur Identifizierung von Chemikalien, welche die Funktion von G $\beta$ 3s hemmen.

24. Beta-3 Untereinheit eines humanen G-Proteins, die höchstens sechs WD-Repeat-Motive aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die G $\beta$ 3s-2 Untereinheit die in Anlage 4 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist.

25. Nucleinsäuresequenz codierend für ein Protein nach Anspruch 24.

26. Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 25 mit der in Anlage 3 dargestellten Sequenz.

27. Verfahren zur Herstellung eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nucleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 25 oder 26 ggf. mit geeigneten Regulationssignalen versieht und in einem Wirtsorganismus zur Expression bringt.

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei die Expression in Immunzellen immundefizienter, insbesondere HIV-positiver Personen erfolgt.

29. Verfahren nach Anspruch 27, wobei die Expression in humanen Körperzellen erfolgt.

30. Verwendung einer Nucleinsäuresequenz gemäß Anspruch 25 oder 26 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheiten.

31. Verwendung einer Nucleinsäuresequenz, nach Anspruch 25 oder 26 zur Erzeugung transgener Tiere.

32. Verwendung einer Nucleinsäuresequenz, die komplementär zu der Nucleinsäuresequenz gemäß Anspruch 25 oder 26 ist zur Herstellung eines Antisense-Arzneimittels zur Therapie oder Prävention von Krankheiten, die mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert sind.

33. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 24 zur Herstellung von spezifisch gegen dieses Protein gerichteten Antikörpern.

Fig.1:

Expression von G $\beta$ 3 und G $\beta$ 3-s in COS-7 - Zellen. Die Aktivierbarkeit von G-Proteinen wird über den Einbau von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S quantifiziert. Die G-Proteine werden dabei durch das Peptid Mastoparan-7 (Mas-7) stimuliert.

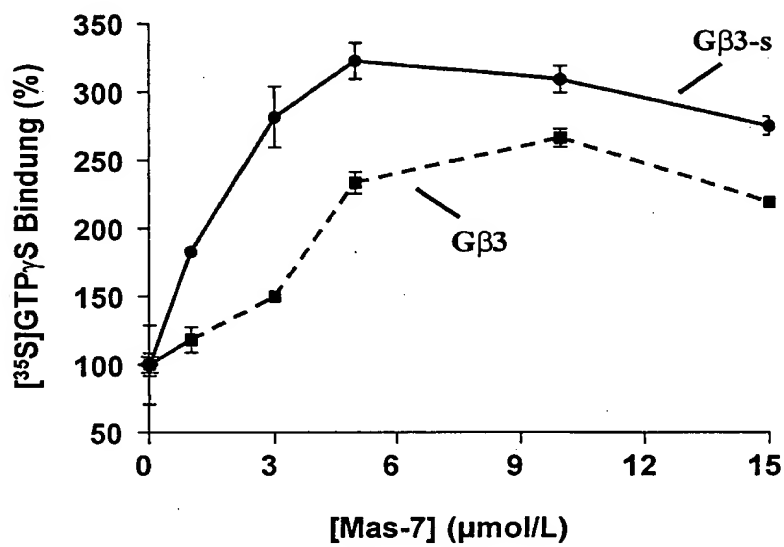


Fig.2:

Expression von G $\beta$ 3 und G $\beta$ 3-s in Sf9 - Insektenzellen, bei gleichzeitiger Expression von G $\alpha$ i3 , G $\gamma$ 5 und des m2-muskarinergen Rezeptors. Die Aktivierbarkeit von G-Proteinen wird über den Einbau von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S quantifiziert. Die G-Proteine werden dabei durch Carbachol stimuliert.

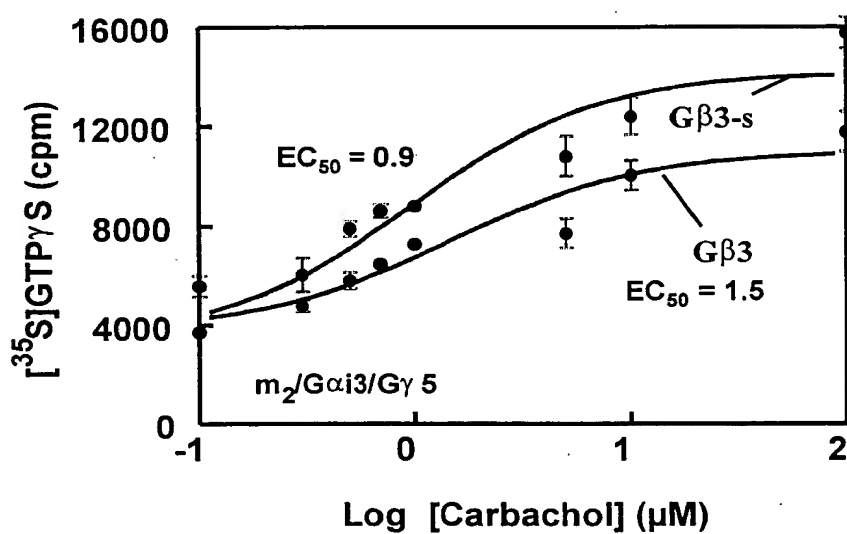


Fig. 3:

Verteilung des Body Mass Index bei 20-30 jährigen Männern in Abhängigkeit vom GNB3 und IRS1 - Genotyp. Individuen mit IRS1 GG-Genotyp, die das GNB3 825T-Allel tragen, weisen einen erhöhten BMI auf. Diesem Effekt wird durch das IRS1 3931A-Allel entgegengewirkt.

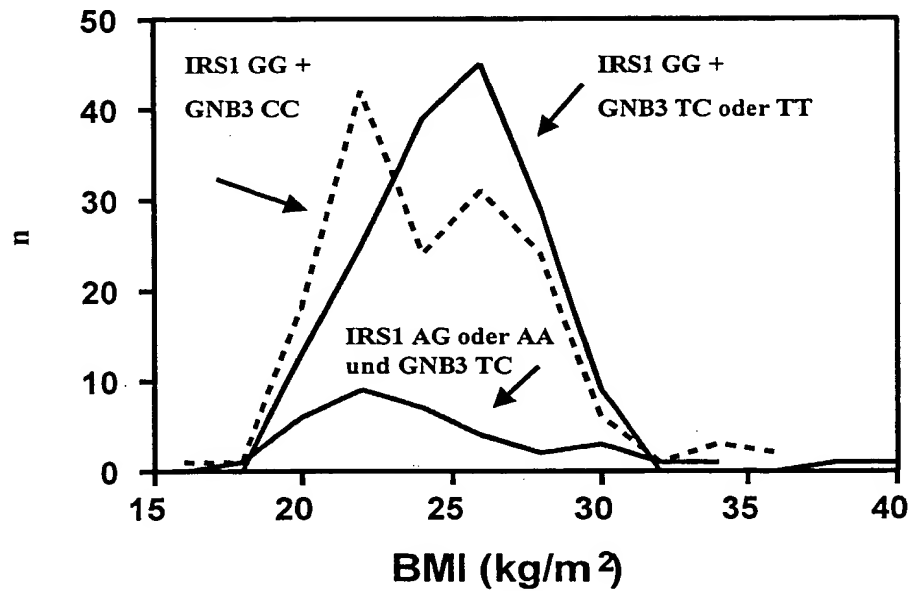




Fig.4:

Frequenz des GNB3 825 T -Allels bei koronarer Herzkrankheit (KHK) und Myokardinfarkt.

Keine KHK = angiographisch ausgeschlossen KHK

KHK = koronare Herzkrankheit ohne Myokardinfarkt

MI = koronare Herzkrankheit und früherer Myokardinfarkt

MI > 1: koronare Herzkrankheit und mehr als ein anamnestischer Myokardinfarkt

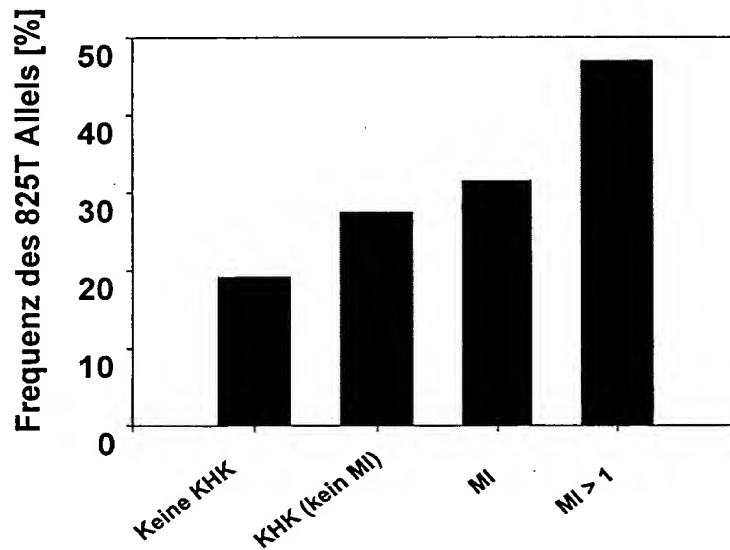


Fig.5:

FMLP - stimulierte Chemotaxis bei menschlichen neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit vom GNB3 Genotyp.

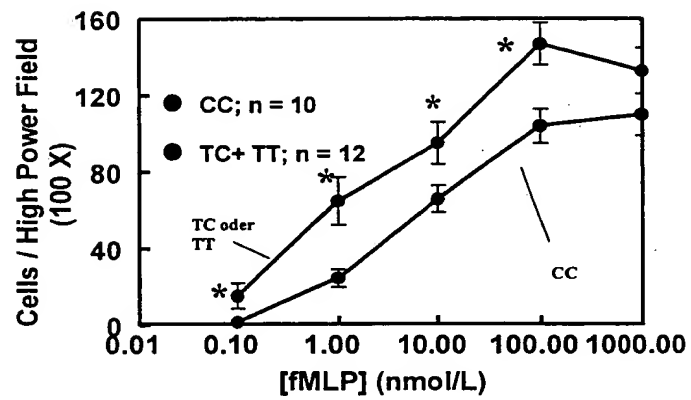


Fig.6:

CD 4 Count (Zahl der CD4-positiven T-Lymphozyten /  $\mu$ l)  
bei männlichen, gesunden Blutspendern (Nichtraucher) in  
Abhängigkeit vom GNB3 - Genotyp.

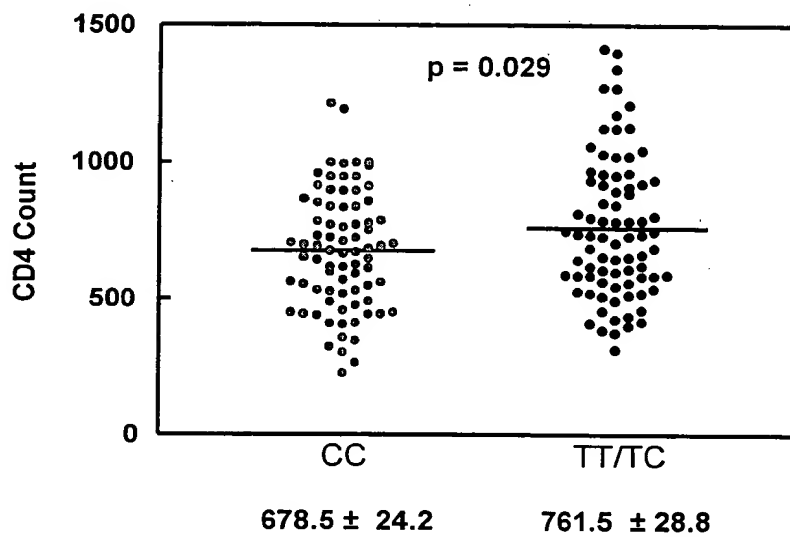


Fig. 7:

Hier ist ein Beispiel für die Chemotaxis menschlicher T-Lymphozyten nach Stimulation mit Stromal Cell-derived Factor 1 $\alpha$  (SDF 1 $\alpha$ ) dargestellt.

(\* =  $p < 0,05$ )

### Enhanced Chemotaxis of T-Lymphocytes from 825T Allele Carriers

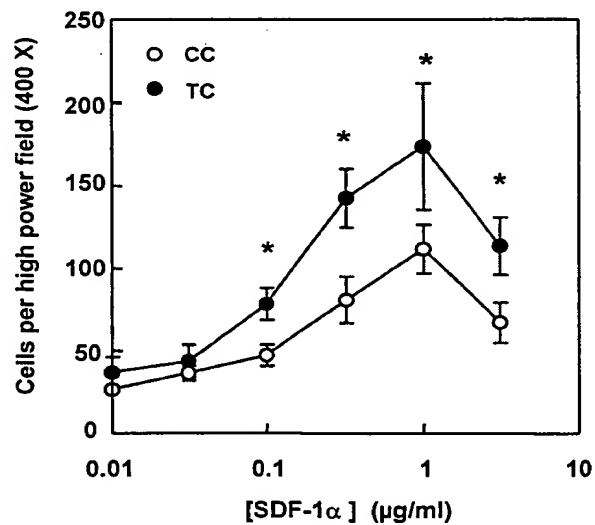


Fig. 8:

Wirkung einer intrakoronaren Applikation des  $\alpha_2$ -adrenergen Agonisten BHT 933 auf die Koronardurchblutung in Abhängigkeit vom GNB3 Genotyp.

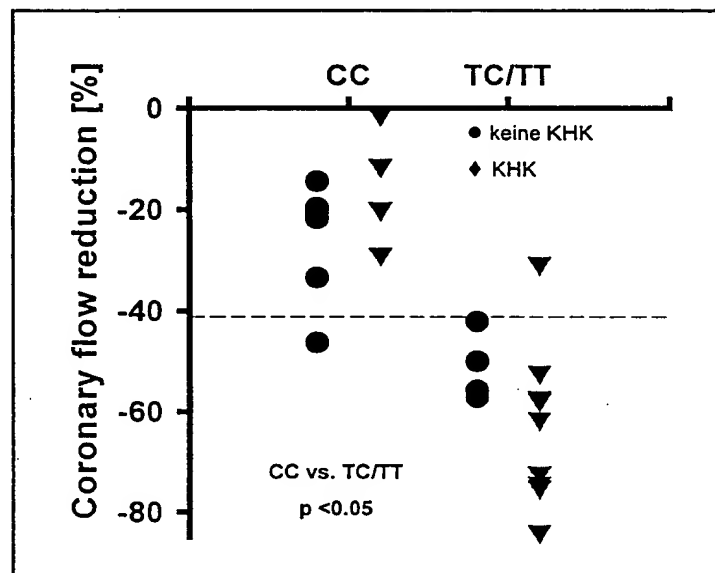


Fig. 9

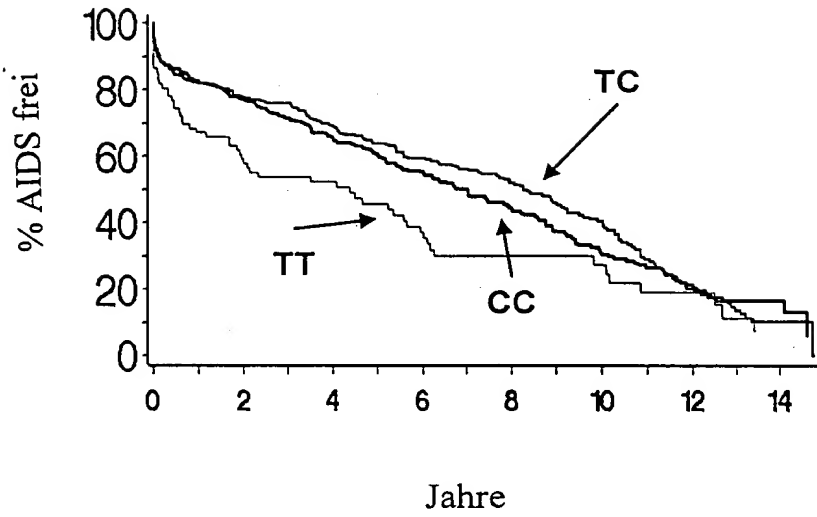


Fig. 10

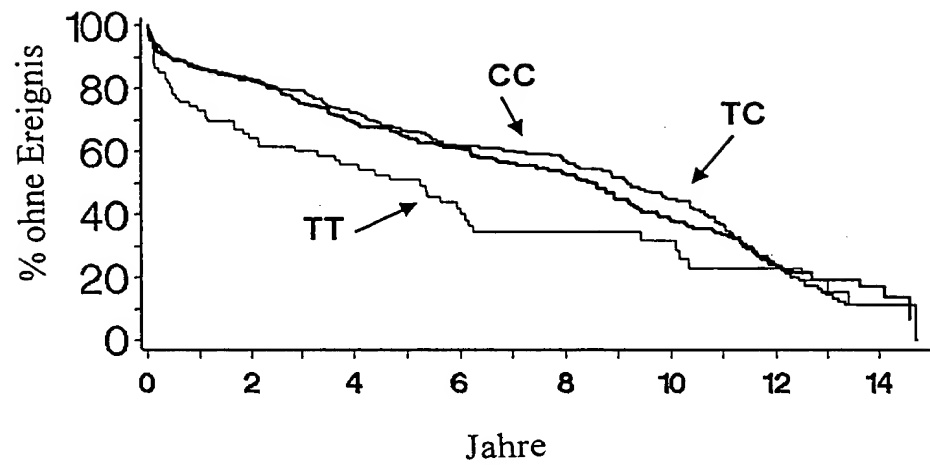


Fig. 11

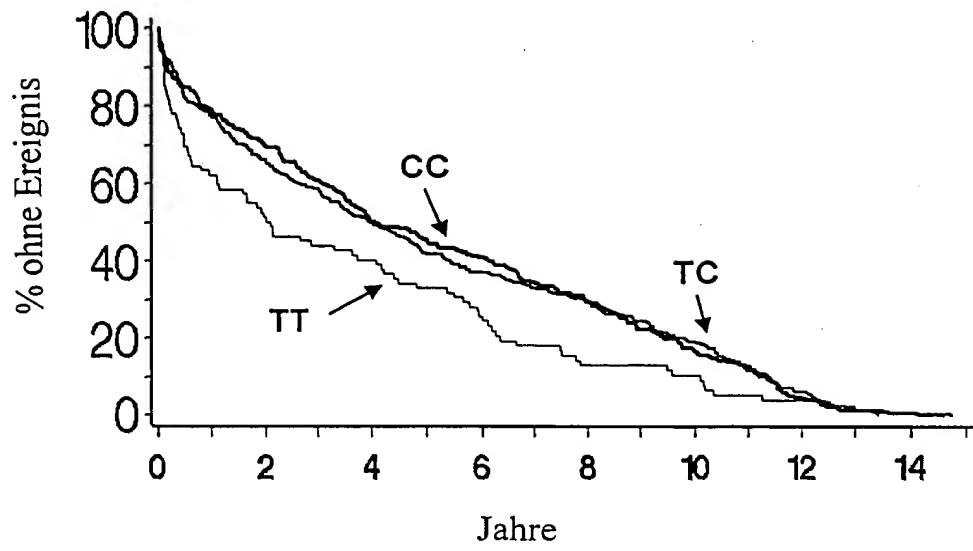




Fig. 12

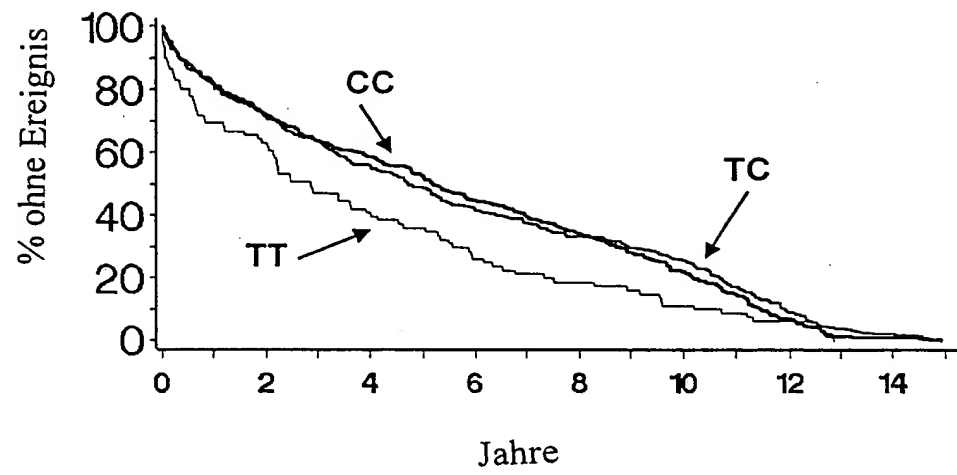


Fig. 13: Detektion von G $\beta$ 3s-2 mittels RT-PCR G $\beta$ 3s-2

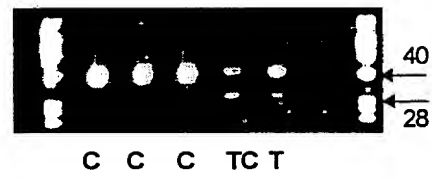


Fig. 14:  
Mögliche Strukturen des G $\beta$ 3 und G $\beta$ 3s/G $\beta$ 3s-2

### Potential Structures of G $\beta$ 3 and G $\beta$ 3s / G $\beta$ 3s-2

---

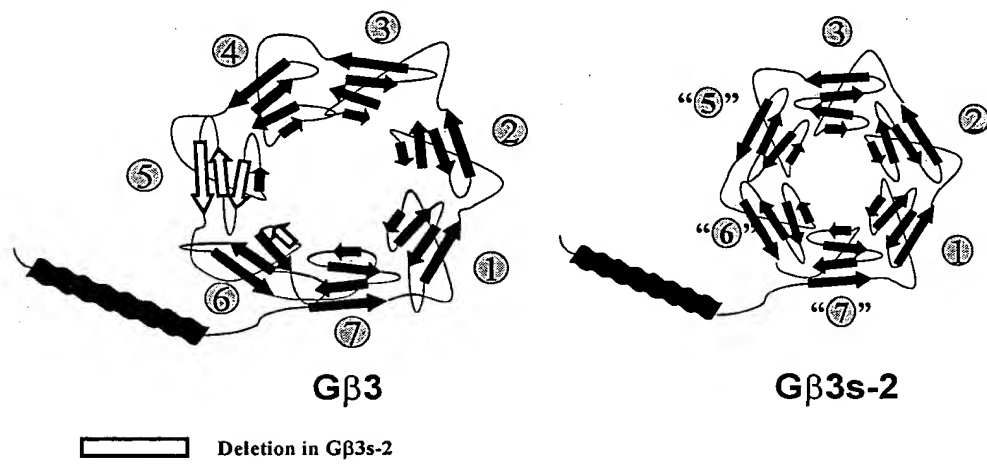


Fig. 15: Verstärkung der G-Protein-Aktivierung in Sf9-Zellen durch G $\beta$ 3-Spleißvarianten

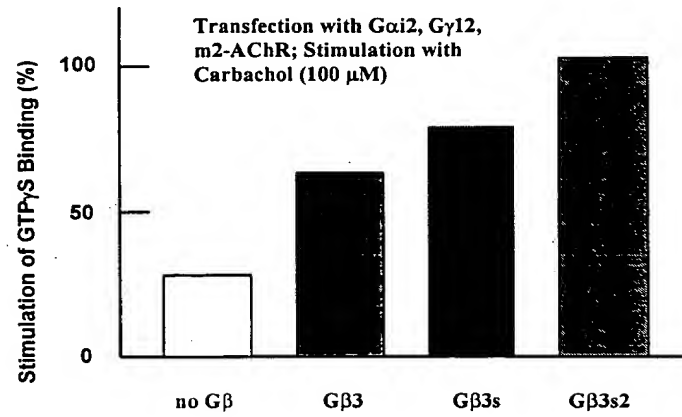
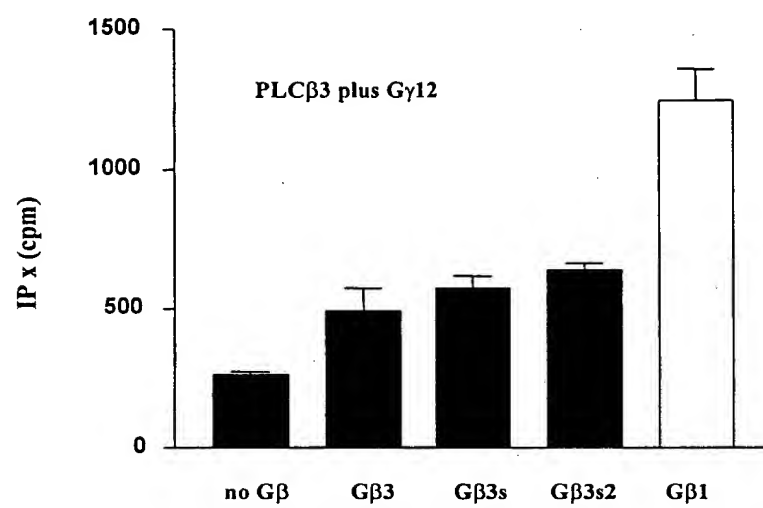


Fig. 16: Stimulation der Phospholipase C $\beta$ 3 durch G $\beta$ 3



## Anlage: Lokalisation des Polymorphismus in cDNA

Anlage 1:  $\beta$ 3-Originalsequenz von Levine

Die Exons sind wechselweise unterstrichen.  
Der Bereich, der durch kryptisches Splicen wegfällt, ist fettgedruckt.

```

1  gggtcgATGG GGGAGATGGA GCAACTGCGT CAGGAAGCGG AGCAGCTCAA GAAGCAGATT
   Start-ATG   EXON 3 nach Ansari-Lari
   Nucleotide 1-6 scheinen nicht zuzutreffen

61  GCAGATGCCA GGAAAGCCTG TGCTGACGTT ACTCTGGCAG AGCTGGTGTC TGGCCTAGAG
    /Beginn EXON 4                                     /EXON 5 Beginn
                                                    ==> ENDE 1 KLON ANSARI

121 GTGGTGGGAC GAGTCCAGAT GCGGACGCGG CGGACGTTAA GGGGACACCT GGCCAAGATT
    EXON 5

181 TACGCCATGC ACTGGGCCAC TGATTCTAAG CTGCTGGTAA GTGCCTCGCA AGATGGGAAG
    EXON 5                                     / Beginn EXON 6

241 CTGATCGTGT GGGACAGCTA CACCACCAAC AAGGTGCACG CCATCCCCT GCGCTCCTCC
    EXON 6                                     / EXON 7

301 TGGGTCATGA CCTGTGCCTA TGCCCCATCA GGGAACCTTG TGGCATGTGG GGGGCTGGAC
    EXON 7

361 AACATGTGTT CCATCTACAA CCTCAAATCC CGTGAGGGCA ATGTCAAGGT CAGCCGGGAG
    EXON 7

421 CTTCTGCTC ACACAGGTTA TCTCTCCTGC TGCCGCTTCC TGGATGACAA CAATATTGTG
    EXON 7                                     /EXON 8

481 ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTGTGCCTTG TGGGACATTG AGACTGGGCA GCAGAAGACT
    EXON 8                                     /EXON 9

                                     kryptisches SPLICING
541 GTATTTGTGG GACACACGGG TGACTGCATG AGCCTGGCTG TGTCTCTGA CTTCAATCTC
    EXON 9
    kryptisches SPLICING

601 TTCATTTCTGG GGGCCTGTGA TGCCAGTGCC AAGCTCTGGG ATGTGCGAGA GGGGACCTGC
    EXON 9
    kryptisches SPLICING /

661 CGTCAGACTT TCACTGGCCA CGAGTCGGAC ATCAACGCCA TCTGTTTCTT CCCCATGGA
    EXON 9                                     / Beginn EXON 10

721 GAGGCCATCT GCACGGGCTC GGATGACGCT TCCTGCCGCT TGTGTGACCT GCGGGCAGAC
    EXON 10

781 CAGGAGCTGA TCTGCTTCTC CCACGAGAGC ATCATCTGCG GCATCACGTC CGTGGCCTTC
    EXON 10      Polymorphismusstelle:      acgtc tgt

841 TCCCTCAGTG GCCGCCTACT ATTCGCTGGC TACGACGACT TCAACTGCAA TGTCTGGGAC
    EXON 10

901 TCCATGAAGT CTGAGCGTGT GGGCATCCTC TCTGGCCACG ATAACAGGGT GAGCTGCCTG
    EXON 10                                     /Beginn EXON 11

961 GGAGTCACAG CTGACGGGAT GGCTGTGGCC ACAGGTTTCT GGGACAGCTT CCTCAAATC
    EXON 11

1021 TGGAAGTGA gaggctggag aaagggaaagt ggaagggcagt gaacacactc agcagccccc
    EXON 11
    End of Open Reading Frame

1081 tgccccagccc catctcattc aggtgttctc ttctatatc cgggtgccat tcccactaag
    EXON 11

```

1141 ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc ttggggaggc agcatcaggg  
EXON 11

1201 acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtcctcac  
EXON 11

1261 agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gccctcccc agccctttgc aggccagca  
EXON 11

1321 gacttgagtc tgaggcccca ggcctagga ttctdcccc agagccacta cctttgtcca  
EXON 11

1381 ggcctgggtg gtatagggcg ttggccctg tgactatggc tctggcacca ctagggtect  
EXON 11

1441 ggcctcttc ttattcatgc ttctccttt ttctacctt tttctctcc taagacacct  
EXON 11

1501 gcaataaagt gtagcaccct ggt  
EXON 11 POLY A SITE

Anlage 2: Sequenz mit den beiden Polymorphismen  
(Numerierung nach der Levine-Sequenz)

```

1      ggggtcgATGG GGGAGATGGA GCAACTGCGT CAGGAAGCGG AGCAGCTCAA GAAGCAGATT
61     GCAGATGCCA GGAAAGCCTG TGCTGACGTT ACTCTGGCAG AGCTGGTGTC TGGCCTAGAG
121    GTGGTGGGAC GAGTCCAGAT GCGGACGCGG CGGACGTTAA GGGGACACCT GGCCAAGATT
181    TACGCCATGC ACTGGGCCAC TGATTCTAAG CTGCTGGTAA GTGCCTCGCA AGATGGGAAG
241    CTGATCGTGT GGGACAGCTA CACCACCAAC AAGGTGCACG CCATCCCACT GCGCTCCTCC
301    TGGGTCATGA CCTGTGCCTA TGCCCCATCA GGGAACTTTG TGGCATGTGG GGGGCTGGAC
361    AACATGTGTT CCATCTACAA CCTCAAATCC CGTGAGGGCA ATGTCAAGGT CAGCCGGGAG
421    CTTTCTGCTC ACACAGGTTA TCTCTCCTGC TGCCGCTTCC TGGATGACAA CAATATTGTG
481    ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTGTGCCTTG TGGGACATTG AGACTGGGCA GCAGAAGACT
541    GTATTTGTGG GACACACGGG TGACTGCATG AGCCTGGCTG TGTCTCCTGA CTTCATCTC
601    TTCATTTTCG GGGCCTGTGA TGCCAGTGCC AAGCTCTGGG ATGTGCGAGA GGGGACCTGC
661    CGTCAGACTT TCACTGGCCA CGAGTCGGAC ATCAACGCCA TCTGTTTCTT CCCCATGGGA
721    GAGGCCATCT GCACGGGCTC GGATGACGCT TCCTGCCGCT TGTTTGACCT GCGGGCAGAC
781    CAGGAGCTGA TCTGCTTCTC CCACGAGAGC ATCATCTGCG GCATCACGTC TGTGGCCTTC
841    TCCCTCAGTG GCCGCCTACT ATTCGCTGGC TACGACGACT TCAACTGCAA TGTCTGGGAC
901    TCCATGAAGT CTGAGCGTGT GGGCATCCTC TCTGGCCACG ATAACAGGGT GAGCTGCCTG
961    GGAGTCACAG CTGACGGGAT GGCTGTGGCC ACAGGTTCTT GGGACAGCTT CCTCAAAATC
1021   TGGAACTGAg gaggctggag aaaggggaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagccccc
1081   tgccccgaccc catctcattc aggtgtttct ttctatatc cggttgccat tcccactaag
1141   ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc tttgggaggc agcatcaggg
1201   acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtccctac
1261   agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gcccctcccc agccctttgc agggccagca
1321   gacttgagtc tgaggcccca ggccctagga ttcctcccc agagccacta cctttgtcca
1381   ggcctgggtg gtatagggcg tttggccctg tgactatggc tctggcacca ctagggtcct
1441   ggcctctctc ttattcatgc tttctccttt ttctaccttt ttttctctcc taagacacct
1501   gcaataaagt gtagcaccct ggt

```



## Anlage 3

Nukleinsäuresequenz der cDNA von G $\beta$ 3 und Darstellung der Deletionen in G $\beta$ 3s und G $\beta$ 3s-2

Numerierung bezogen auf die cDNA von Levine et al. (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T., Jr., Helman, L.J., and Ahn, T.G. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87(6):2329-2333, 1990) Die Numerierung beginnt hierbei nicht mit dem Startkodon ATG, sondern 6 Nukleotide früher im 5'-Bereich.

1 gggtcgATGG GGGAGATGGA GCAACTGCGT CAGGAAGCGG AGCAGCTCAA GAAGCAGATT  
Start-ATG EXON 3

Nucleotide 1-6 scheinen nicht zuzutreffen

61 GCAGATGCCA GGAAAGCCTG TGCTGACGTT ACTCTGGCAG AGCTGGTGTC TGGCCTAGAG  
/Beginn EXON 4 /EXON 5 Beginn

121 GTGGTGGGAC GAGTCCAGAT GCGGACGCGG CGGACGTTAA GGGGACACCT GGCCAAGATT  
EXON 5

181 TACGCCATGC ACTGGGCCAC TGATTCTAAG CTGCTGGTAA GTGCCTCGCA AGATGGGAAG  
EXON 5 / Beginn EXON 6

241 CTGATCGTGT GGGACAGCTA CACCACCAAC AAGGTGCACG CCATCCCACT GCGCTCCTCC  
EXON 6 / EXON 7

301 TGGGTCATGA CCTGTGCCTA TGCCCCATCA GGGAACTTTG TGGCATGTGG GGGGCTGGAC  
EXON 7

361 AACATGTGTT CCATCTACAA CCTCAAATCC CGTGAGGGCA ATGTCAAGGT CAGCCGGGAG  
EXON 7

421 CTTTCTGCTC ACACAGGTTA TCTCTCCTGC TGCCGCTTCC TGGATGACAA CAATATTGTG  
EXON 7 /EXON 8

~~Deletion bei G $\beta$ 3s~~

481 ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTG ~~TGGCTTTC TGGCTTTC TGGCTTTC TGGCTTTC~~ TGGCTTTC  
EXON 8 /EXON 9

~~741 CTATTTCCTCC CAGCAGCCG TCACTGGCCG ACCCTGCCG TCTCTCTCA CTTCTATCTG~~

EXON 9

~~801 ATTCTTTTCCG CCCCCCTCTA TCCCA~~ TGCC AAGCTCTGGG ATGTGCGAGA GGGGACCTGC

EXON 9

~~Deletion in GB32~~

661 CGTCAGACTT TCACTGGCCA CGAGTCGGAC ATCAACGCCA TCTGTTT ~~TTT GCGCAATCTG~~

EXON 9

/ Beginn EXON 10

Intron dazwischen 1607 bp

~~Deletion in GB32~~

721 ~~TATCTCTATCTG TCTCTCTCTG TCACTGGCCG TCACTGGCCG TCACTGGCCG TCACTGGCCG~~

EXON 10

781 ~~CAGGACCTCT TCTCTCTCTG TCACTGGCCG TCACTGGCCG TCACTGGCCG TCACTGGCCG~~

EXON 10

Polymorphismusstelle C825T: acgtc tgt

841 TCCCTCAGTG GCCGCCTACT ATTCGCTGGC TACGACGACT TCAACTGCAA TGTCTGGGAC

EXON 10

901 TCCATGAAGT CTGAGCGTGT GGGCATCCTC TCTGGCCACG ATAACAGGGT GAGCTGCCTG

EXON 10

/Beginn EXON 11 (Intron dazw. 989 bp)

961 GGAGTCACAG CTGACGGGAT GGCTGTGGCC ACAGGTTCTT GGGACAGCTT CCTCAAATC

EXON 11

1021 TGGAAGTGAg gaggctggag aaagggaggt ggaaggcagt gaacacactc agcagccccc

EXON 11

End of Open Reading Frame B3-3

1081 tgcccgaccc catctcattc aggtgttctc ttctatatctc cgggtgccat tcccactaag

EXON 11

1141 ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc tttgggaggc agcatcaggg

EXON 11

1201 acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtccacac

EXON 11

1261 agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gccctcccc agccctttgc aggcccagca  
EXON 11

1321 gacttgagtc tgaggcccca ggccttagga ttctccccc agagccacta cctttgtcca  
EXON 11

tctggcac■a cta

1381 ggcctgggtg gtatagggcg tttggccctg tgactatggc tctggcac■a ctagggtcct  
EXON 11

1441 ggccctcttc ttattcatgc tttctccttt ttctaccttt tttctctccc taagacacct  
EXON 11

1501 gcaataaagt gtagcaccct ggt  
EXON 11 POLY A SITE

Anlage 4: Aminosäuresequenz von G $\beta$ 3s-2

## Kombinierte Darstellung

1	Met	Gly	Glu	Met	Glu	Gln	Leu	Arg	Gln	Glu	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys	Lys	16
1	ATG	GGG	GAG	ATG	GAG	CAA	CTG	CGT	CAG	GAA	GCG	GAG	CAG	CTC	AAG	AAG	48
17	Gln	Ile	Ala	Asp	Ala	Arg	Lys	Ala	Cys	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Ala	Glu	32
49	CAG	ATT	GCA	GAT	GCC	AGG	AAA	GCC	TGT	GCT	GAC	GTT	ACT	CTG	GCA	GAG	96
33	Leu	Val	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Val	Gly	Arg	Val	Gln	Met	Arg	Thr	Arg	48
97	CTG	GTG	TCT	GGC	CTA	GAG	GTG	GTG	GGA	CGA	GTC	CAG	ATG	CGG	ACG	CGG	144
49	Arg	Thr	Leu	Arg	Gly	His	Leu	Ala	Lys	Ile	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Ala	64
145	CGG	ACG	TTA	AGG	GGA	CAC	CTG	GCC	AAG	ATT	TAC	GCC	ATG	CAC	TGG	GCC	192
65	Thr	Asp	Ser	Lys	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Leu	Ile	80
193	ACT	GAT	TCT	AAG	CTG	CTG	GTA	AGT	GCC	TCG	CAA	GAT	GGG	AAG	CTG	ATC	240
81	Val	Trp	Asp	Ser	Tyr	Thr	Thr	Asn	Lys	Val	His	Ala	Ile	Pro	Leu	Arg	96
241	GTG	TGG	GAC	AGC	TAC	ACC	ACC	AAC	AAG	GTG	CAC	GCC	ATC	CCA	CTG	CGC	288
97	Ser	Ser	Trp	Val	Met	Thr	Cys	Ala	Tyr	Ala	Pro	Ser	Gly	Asn	Phe	Val	112
289	TCC	TCC	TGG	GTC	ATG	ACC	TGT	GCC	TAT	GCC	CCA	TCA	GGG	AAC	TTT	GTG	336
113	Ala	Cys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Met	Cys	Ser	Ile	Tyr	Asn	Leu	Lys	Ser	128
337	GCA	TGT	GGG	GGG	CTG	GAC	AAC	ATG	TGT	TCC	ATC	TAC	AAC	CTC	AAA	TCC	384
129	Arg	Glu	Gly	Asn	Val	Lys	Val	Ser	Arg	Glu	Leu	Ser	Ala	His	Thr	Gly	144
385	CGT	GAG	GGC	AAT	GTC	AAG	GTC	AGC	CGG	GAG	CTT	TCT	GCT	CAC	ACA	GGT	432
145	Tyr	Leu	Ser	Cys	Cys	Arg	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Asn	Ile	Val	Thr	Ser	160
433	TAT	CTC	TCC	TGC	TGC	CGC	TTC	CTG	GAT	GAC	AAC	AAT	ATT	GTG	ACC	AGC	480
161	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Cys	Ala	Leu	Trp	Asp	Ile	Glu	Thr	Gly	Gln	Gln	176
481	TCG	GGG	GAC	ACC	ACG	TGT	GCC	TTG	TGG	GAC	ATT	GAG	ACT	GGG	CAG	CAG	528
177	Lys	Thr	Val	Phe	Val	Gly	His	Thr	Gly	Asp	Cys	Met	Ser	Leu	Ala	Val	192
529	AAG	ACT	GTA	TTT	GTG	GGA	CAC	ACG	GGT	GAC	TGC	ATG	AGC	CTG	GCT	GTG	576

193 Ser Pro Asp Phe Asn Leu Phe Ile Ser Gly Ala Cys Asp Ala Ser Ala 208  
577 TCT CCT GAC TTC AAT CTC TTC ATT TCG GGG GCC TGT GAT GCC AGT GCC 624

209 Lys Leu Trp Asp Val Arg Glu Gly Thr Cys Arg Gln Thr Phe Thr Gly 224  
625 AAG CTC TGG GAT GTG CGA GAG GGG ACC TGC CGT CAG ACT TTC ACT GGC 672

225 His Glu Ser Asp Ile Asn Ala Ile Cys Phe Phe Ser Leu Ser Gly Arg 240  
673 CAG GAG TCG GAC ATC AAC GCC ATC TGT TTC TTC TCC CTC AGT GGC CGC 720

241 Leu Leu Phe Ala Gly Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Asn Val Trp Asp Ser 256  
721 CTA CTA TTC GCT GGC TAC GAC GAC TTC AAC TGC AAT GTC TGG GAC TCC 768

257 Met Lys Ser Glu Arg Val Gly Ile Leu Ser Gly His Asp Asn Arg Val 272  
769 ATG AAG TCT GAG CGT GTG GGC ATC CTC TCT GGC CAC GAT AAC AGG GTG 816

273 Ser Cys Leu Gly Val Thr Ala Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser 288  
817 AGC TGC CTG GGA GTC ACA GCT GAC GGG ATG GCT GTG GCC ACA GGT TCC 864

289 Trp Asp Ser Phe Leu Lys Ile Trp Asn \*\*\*  
865 TGG GAC AGC TTC CTC AAA ATC TGG AAC TGA

GS/jo 980364  
March 26, 1999

This invention relates to a new nucleic acid sequence coding for the Gbeta3-subunit of the human G protein and the use of the Gbeta3 subunits of the G proteins for determining the risk of developing a disease which is associated with a G protein dysregulation.

Heterotrimeric guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) are of outstanding importance in intracellular signal transduction. They mediate the relay of extracellular signals after stimulation of hormone receptors and other receptors which undergo a conformation change after receptor activation. This leads to activation of G proteins which subsequently can activate or inhibit intracellular effectors (for example, ion channels, enzymes). G proteins control intracellular signal processing after hormone stimulation of heptahelical receptors in the cell membrane, but also after stimulation of receptors with intrinsic tyrosine kinase activity. Regulated cell functions include among others cell division and cell growth, contraction, release of cell contents, and much more.

Heterotrimeric G proteins are composed of three subunits, the alpha, beta and gamma subunits. To date several different alpha subunits, 5 beta subunits and roughly 12 gamma subunits have been detected using biochemical and molecular biological methods (Birnbaumer, L. and Birnbaumer, M., Signal transduction by G proteins: 1994 edition. J. Recept. Res. 15: 213-252, 1995; Offermans, S. and Schultz, G. Complex information processing by the transmembrane signalling system involving G proteins. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 350: 329-338, 1994; Nuernberg, B., Gudermann, T. and Schultz, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2, G proteins: structure and function. J. Mol. Med. 73:123-132, 1995; Neer, E.J. Heterotrimeric G protein: Organizers of Transmembrane Signals. Cell 80: 249-257, 1995; Rens-Domiano, S. and Hamm, H.E. Structural and functional relationships of heterotrimeric G proteins. FASEB J. 9: 1059-1066, 1995).

The receptor-mediated activation of certain alpha subunits can be inhibited by pretreatment with pertussis toxin (PTX). They include especially the alpha isoforms alpha-11, alpha-12 and alpha-13 and different alpha-subunits. These G proteins are also called "PTX-sensitive G proteins".

Betagamma subunits perform important functions in G protein activation and in the modulation of intracellular reactions. All previously known G protein beta subunits on the level of the nucleotide sequence and on the level of the amino acid sequence have high homologies. In this respect these similarities are found not only within the human beta subunits (Gbeta1, Gbeta2, Gbeta 3), but also in comparison with beta subunits of other species, for example fruit flies or yeasts.

Recently a base change in exon 10 (C825T) which leads to alternative splicing of exon 9 was described in the human GNB3 gene which codes for the Gbeta3 subunit. Alternative splicing is promoted by a cryptic splice site in exon 9, the base exchange C825T which is located farther away intensifying the splicing. The alternative splice product (Gbeta3s) has a loss of 123 bp (= 41 amino acids). The GNB3-825T allele is associated with increased activation capacity of G proteins and essential hypertension (Siffert, W., Rosskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E.; Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., and Horsthemke, B. Association of a human G protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat. Genet.* 18(1): 45-48, 1998; Clapham, D.E. and Neer, E.J. G protein betagamma subunits. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 37:167-203, 1997; Hamm, H.E. and Gilchrist, A. Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin.Cell Biol.* 8:189-196, 1996).

This human GNB3 gene has been described by Levine et al. (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T. Jr., Helman, L.J. and Ahn, T.G. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 87(6), 2329-2333 (1990)).

The subject matter of the invention is a new human cDNA for the Gbeta3 subunit of human G protein.

It has been unexpectedly found that in the human GNB3 gene there is additional polymorphism which is called "C1429T" hereinafter. This polymorphism is

located at position 1429 of the cDNA. This corresponds to exon 11 of the pre-mRNA, but outside the open read frame in the 3' untranslated area.

This polymorphism is in pronounced distribution disequilibrium with the known C825T polymorphism such that almost all GBN3-825C alleles have the genotype 1429C and almost all GBN3-825T alleles have the genotype 1429T. Thus this polymorphism C1429T is just as well suited as polymorphism G825T for detection of increased activation capacity of G proteins.

The polymorphism C1429T is referenced to the cDNA sequence as was described by Levine et al. Here replacement of the C by a T takes place on position 1429 of the cDNA:

```
1381 qqcctgggtg gtagggcg ttggccctg tgactatggc tctggcac(c/t)a ctagggtcct
```

The complete cDNA sequence is listed in appendix 1.

Referenced to the genomic sequence of the GBN3 locus as was described by Ansari-Lari et al (Ansari-Lari, M.A., Muzny, D.M., Lu, J., Lu, F., Lilley, C.E., Spanos, S., Malley, T. and Gibbs, R.A. A gene-rich cluster between the CD4 and triosephosphate isomerase genes at human chromosome 12p13. *Genome Res.* 6 (4),314-326 (1996)), this polymorphism is located as follows (C59308T):

```
59281 TTGGCCCTGT GACTATGGCT CTGGCAC(C/T)AC TAGGGTCCTG  
GCCCTCTTCT TATTCATGCT
```

The complete genomic sequence is listed in appendix 2.

This polymorphism is detected using methods which are familiar to one skilled in the art, such as specific hybridization, sequencing, PCR reaction with subsequent restriction analysis, DNA chip technology, single strand conformation polymorphism, etc. In one sample experiment detection was done by amplification of the corresponding gene section and subsequent analysis of the restriction fragment length polymorphism in which the restriction enzymes BanI, BshNI, Eco64I or their isoschizomers are used.

As a result there is good agreement between the genotype on positions 825 and 1429:



Genotype on position 825 of GNB3 cDNA	Genotype TT at position 1429 of cDNA	Genotype TC at position 1429 of cDNA	Genotype CC at position 1429 of cDNA
TT 119	111 (93,3 %)	8 (6,7%)	0
TC 116	3 (2,6 %)	103 (88,8 %)	10 (8,6 %)
CC 124	0 (0 %)	2 (1,6 %)	122 (98,4 %)

The new nucleic acid sequence can be used to produce antisense drugs for treatment or prevention of diseases, one nucleic acid sequence which is complementary nucleic acid sequence being used to produce the antisense drug. Here patients can be treated for example with antisense oligonucleotides or vectors for prevention of transcription or translation of the Gbeta3 subunit.

The subject matter of the invention is furthermore the use of beta3 subunits of G proteins for determining the risk of contracting a disease which is associated with G protein dysregulation.

Although the Gbeta3s splice variant which has polymorphism C1429T or which can be attributed to polymorphism C825T, in combination with the G protein subunits Galphai2 and Ggamma5, can form a functional heterotrimer, it was unclear how Gbeta3s leads to increased activation capacity of the G proteins.

The subject matter of this invention is based on the finding that the Gbeta3s subunit leads to increased activation capacity of G proteins. The increased activation capacity of G proteins was detected via transfection of the corresponding cDNAs and the expression of Gbeta3 and Gbeta3s in the COS-7 transfection system which is well known to one skilled in the art. Here it was found that the activation capacity of G proteins after transfection of Gbeta3s is clearly increased compared to Gbeta3 (Figure 1). To quantify the activation capacity of G proteins, here the incorporation of radioactively tagged [35S]GTPgammaS into G protein alpha-subunits after stimulation with the peptide mastoparan-7 (Mas-7) was measured.

Similar results can be achieved in the Sf9 insect cells expression system (Figure 2). Here the m2-muscarinergic receptor is expressed together with the G protein subunits Galphai3 and Ggamma5 and either Gbeta3 or Gbeta3-s in the Sf9 system. After stimulation with the agonist carbachol, in the presence of Gbeta 3, increased potency and increased efficiency of the agonist carbachol were observed with reference to the stimulation capacity of G proteins.

These experiments show that the splice variant Gbeta3-s is originally responsible for increased activation of G proteins. Furthermore these experiments prove that the protein is suitable for gene therapy for diseases which are associated with one such G-protein dysregulation for purposes of achieving increased cellular reactivity.

The diseases which are associated with G protein dysregulation are defined as those diseases in which the G protein is involved in signal transduction and does not perform its function physiologically. The dysregulation can have a series of causes, for example a change in the structure gene or an altered gene expression. This invention relates to diseases which are associated with the above described GNB3-825T allele or GNB3-1429 allele. They include diabetes mellitus (type 2), overweight and adiposity, coronary heart disease, immune diseases as a result of the intensified function of the immune system, and risky pregnancies with the danger of premature birth.

The following example relates to studies with the GNB3-825T allele. As a result of the extensive agreement (coupling equilibrium) between the genotype at positions 825 and 1429 these examples and the conclusions drawn from the experimental results are likewise valid for the GNB3-1429T allele.

### **1. Prediction of diabetes mellitus (type 2)**

Type-2 diabetes (synonyms: adult diabetes, non-insulin dependent diabetes) is a serious disease with high cardiovascular morbidity and mortality. Genetic influences and overweight contribute heavily to the pathogenesis. Type-2 diabetes often begins as insulin resistance which is first compensated by increased insulin secretion so that the affected individuals remain without symptoms (euglycemic). Only when the increased insulin secretion can no longer be maintained does diabetes with increased blood sugar levels occur. On the cellular level changes in components of insulin signal transduction, for example in the insulin receptor substrate 1 (IRS-1), PT-3 kinases, protein kinases, etc., can cause insulin resistance. But also after cell stimulation with agonists (for example, angiotensin II) which activate the G protein-coupled receptors can cellular insulin resistance be caused. The action of subsequent stimulation with insulin is then clearly reduced (Polonsky, K.S., Sturis, J., and Bell, G.I. Non-insulin dependent diabetes mellitus - A genetically programmed failure of the beta cell to

compensate for insulin resistance. *N. Engl. J. Med.* 334:777-783, 1996; O'Doherty, R. Stein, D. and Foley, J. Insulin resistance. *Diabetologia* 40 Suppl 3:B10-5:B10-5, 1997; Kahn, C.R., Vicent, D., and Doria, A. Genetics of non-insulin dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.* 47:509-531, 1996; Hansen, T., Andersen, C.B., Echwald, S.M., Urhammer, S.A., Clausen, J.O., Vestergaard, H., Owens, D., Hansen, L. and Pedersen, O. Identification of a common amino acid polymorphism in the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase: effects on glucose disappearance constant, glucose effectiveness, and the insulin sensitivity index. *Diabetes* 46(3): 494-501, 1997; Folli, F., Kahn, C.R., Hansen, H., Bouchie, J.L. and Feener, E.P. Angiotensin II inhibits insulin signalling in aortic smooth muscle at multiple levels - A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin crosstalk. *J. Clin. Invest.* 100:2158-2169, 1997; Zhang, Y., Wat, N., Stratton, I.M., Warren-Perry, M.G., Orho, M., Groop, L. and Turner, R.C. UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and b3-adrenergic receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. *Diabetologia* 39:1505-1511, 1996; Alming, K., Bjorbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Echwald, S. and Pedersen, O. Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342:828-832, 1993; Laakso, M., Malkki, M., Kekalainen, P., Kuusisto, J., and Deeb, S.S. Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 94: 1141-1146, 1994).

This G protein activation leads to phosphorylation of IRS-1 on serine residues, by which the phosphorylation induced by insulin on tyrosine residues is reduced. As a result a reduced interaction of IRS-1 occurs with the insulin receptor and the PI-3 kinase, i.e. reduced insulin action. An increased activation capacity of the G proteins which is caused by the GNB3 825T allele and the associated splice variant Gbeta3-s in vivo clearly intensifies the tendency to insulin resistance.

It has now been shown that with the simultaneous presence of mutations in components of insulin signal transduction (IRS1 gene, 3931A variant, Gly971Arg, p85 alpha regulatory subunit of PI3 kinase (1020 G -> A; codon 326 Met -> Ile; beta3 adrenergic receptor (Trp64Arg); beta2-adrenergic receptor (here especially Arg16Gly

variant and the Gln27Glu variant); tumor necrosis factor alpha; leptine or the leptine receptor) which lead to insulin resistance, and the GNB3-825T allele, the tendency to insulin resistance and to diabetes rises drastically. This connection opens the possibility of diagnosis of a type-2 diabetes mellitus associated with the GNB3-825T allele and prediction of one such genetically induced tendency to type-2 diabetes mellitus in still healthy individuals without complaints.

The DNA from more than 700 patients with type-2 diabetes and from 1400 healthy controls was obtained for proof. The frequencies of the GNB3-825T allele and the IRS-1-Gly971Arg variant were compared. Table 1 shows first of all a comparison of the allele frequencies in controls and cases:

Table I: Allele frequencies in controls and type 2 diabetics

		Controls			Diabetics		
		All	Men	Women	All	Men	Women
<b>Total, n</b>		1464	962	502	720	320	400
<b>Genotype, n (%) :</b>							
<b>GNB3</b>	TT	116 (8)	83 (9)	33 (7)	61 (8)	32 (10)	29 (7)
	TC	585 (40)	360 (37)	225 (45)	345 (48)	161 (50)	184 (46)
	CC	763 (52)	519 (54)	244 (49)	314 (44)	127 (40)	187 (47)
	FT	0.28	0.27 <sup>1</sup>	0.29	0.32 <sup>2</sup>	0.35 <sup>3</sup>	0.30
<b>IRS1</b>	AA	5 (0)	4 (0)	1 (0)	8 (1)	4 (1)	4 (1)
	AG	159 (11)	108 (11)	51 (10)	108 (15)	58 (18)	50 (13)
	GG	1300 (89)	850 (88)	450 (90)	604 (84)	258 (81)	346 (87)
	FA	0.06	0.06	0.05	0.09 <sup>4</sup>	0.10 <sup>5</sup>	0.07 <sup>6</sup>
<b>Age (SD)</b>		49 (10)	48 (10)	50 (9)	63 (9)	62 (9)	64 (9)
<b>Age when diagnosed (SD)</b>					46 (10)	45 (10)	47 (10)
<b>BMI, kg / m<sup>2</sup> (SD)</b>		26.9 (3.9)	27.0 (3.4)	26.3 (4.8)	28.9 (4.8)	28.4 (4.4) <sup>6</sup>	29.3 (5.0)
<b>Nephropathy, n (%)</b>					198 (31)	105 (36)	93 (28)
<b>Hypertension, n (%)</b>					464 (67)	181 (59)	283 (73)

Values correspond to n (%) for alleles and diabetes-associated diseases and averages (SD) for continuous variables. <sup>1</sup>,  $p < 0.02$  ( $\chi^2 = 8.1$ ) versus control females; <sup>2</sup>,  $p < 0.001$  ( $\chi^2 = 14.4$ ) versus all controls; <sup>3</sup>,  $p < 0.001$  ( $\chi^2 = 20.0$ ) versus control males; <sup>4</sup>,  $p < 0.005$  ( $\chi^2 = 12.9$ ) versus all controls; <sup>5</sup>,  $p < 0.01$  ( $\chi^2 = 13.2$ ) versus control males; <sup>6</sup>,  $p < 0.14$  ( $\chi^2 = 3.1$ ) versus control females.

The following tables IIa and IIb show the risk for carriers of the GNB3-825T allele or carriers of the IRS-3931A allele (simple effects, Table II.1) or for carriers of both alleles (combined effects Table II.2) for developing type-2 diabetes. The risk here is expressed as an age-adjusted odds ratio, the odds ratio for the case-control studies corresponding roughly to the relative risk in prospective studies.

Table II: Odds ratios for diabetes for carriers of the GNB3-T825 allele, the IRS-A-3931 allele or both alleles

Age-adjusted odds ratios are shown

II.1 Single effects			All					Men					Women				
Genes	Allele	Control (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-value	control (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-value	Control (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-value				
<i>GNB3</i>	TT/CC	116 / 763	61 / 314	1.25 / (0.81- 1.92)	0.3180	83 / 519	32 / 127	1.44 / (0.83- 2.51)	0.2002	33 / 244	29 / 187	1.22 / (0.60 - 2.46)	0.5882				
<i>GNB3</i>	TC/CC	585 / 763	345 / 314	1.48 / (1.17- 1.87)	0.0011	360 / 519	161 / 127	1.86 / (1.35- 2.57)	0.0002	225 / 244	184 / 187	1.12 / (0.79 - 1.58)	0.5351				
<i>GNB3</i>	TT + TC/CC	701 / 763	406 / 314	1.44 / (1.15- 1.80)	0.0015	443 / 519	193 / 127	1.78 / (1.31- 2.43)	0.003	258 / 244	213 / 187	1.13 / (0.80- 1.58)	0.4834				
<i>IRS1</i>	AA/GG	5 / 1300	8 / 604	2.26 / (0.53- 9.59)	0.2686	4 / 850	4 / 285	1.71 / (0.32- 9.12)	0.5300	1 / 450	4 / 346	6.74 / (0.42- 109.57)	0.1797				
<i>IRS1</i>	AG/GG	59 / 1300	108 / 604	1.35 / (0.97- 1.89)	0.0802	108 / 850	58 / 258	1.76 / (1.14- 2.69)	0.0100	51 / 450	50 / 346	0.99 / (0.57- 1.72)	0.9762				
<i>IRS1</i>	AA + AG/GG	164 / 1300	116 / 604	1.38 / (1.00- 1.92)	0.0531	112 / 850	62 / 258	1.75 / (1.15- 2.67)	0.0086	52 / 450	54 / 346	1.07 / (0.62- 1.83)	0.8122				

Table II: Odds ratios for diabetes for carriers of the GNB3-T825 allele, the IRS1-A-3931 allele or both alleles

Age-adjusted odds ratios are shown

II.2 Combined effects													
Genes	Allele	All				Men				Women			
		Control (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-value	Control (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-value	Control (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-value
<i>GNB3</i> ( <i>IRS1</i> GG)	TT / CC	106 684	50 264	1.13 (0.70- 1.81)	0.6156	75 461	25 104	1.31 (0.71- 2.42)	0.3926	31 223	25 160	1.09 (0.52- 2.32)	0.8157
<i>GNB3</i> ( <i>IRS1</i> GG)	TC / CC	510 684	290 264	1.53 (1.19- 1.96)	0.0010	314 461	129 104	1.90 (1.33- 2.70)	0.0004	196 223	161 160	1.19 (0.82- 1.72)	0.3600
<i>GNB3</i> ( <i>IRS1</i> GG)	TT+TC/ CC	616 / 684	340 264	1.46 (1.15- 1.86)	0.0022	389 461	154 104	1.78 (1.27- 2.50)	0.0008	227 223	186 160	1.18 (0.82- 1.68)	0.3743
<i>IRS1</i> ( <i>GNB3</i> CC)	AA + AG / GG	79 684	50 264	1.48 (0.90- 2.43)	0.1198	58 461	23 104	1.78 (0.93- 3.38)	0.0782	21 223	27 160	1.33 (0.59- 3.00)	0.4984
<i>IRS1</i> + <i>GNB3</i>	TT + AA or AG/ CC + GG	10 684	11 264	3.38 (1.13- 10.08)	0.0291	8 / 461	7 / 104	4.03 (1.12- 14.56)	0.0333	2 / 223	4 / 160	3.39 (0.49- 31.60)	0.1975
<i>IRS1</i> + ( <i>GNB3</i> )	TC + AA or AG / CC + GG	75 684	55 264	1.69 (1.05- 2.73)	0.0311	43 461	32 104	2.82 (1.52- 5.23)	0.0010	28 223	23 160	0.89 (0.41- 1.93)	0.7706
<i>IRS1</i> + <i>GNB3</i>	TC or TT + AA or AG / CC + GG	85 684	66 264	1.87 (1.19- 2.92)	0.0062	54 461	39 104	2.99 (1.69- 5.30)	0.0002	31 223	27 160	1.05 (0.51- 2.17)	0.8959

A clear risk increase for type-2 diabetes for carriers of the GNB3-825T allele or carriers of the IRS-3931A allele (Tables II.1 and II.2) is apparent. A drastic risk increase can be found in individuals in whom both genes are changed. Thus the detection of the GNB3-825T allele can be used to ascertain in the affected individual the tendency to develop type-2 diabetes or to determine a genetically induced cause of a condition which has already occurred.

## **2. Prediction of adiposity/overweight**

The regulation of the body mass index (BMI), a measure of the ratio of body weight to body size, is determined by many genes. Overweight is up to roughly 40% genetically determined, but is also caused by excess calorie intake with existing lack of exercise. The Gbeta3-s splice version is associated with the cellular phenotype of increased cell growth. Thus it is also possible that the GNB3-825T allele predisposes to increased body growth, among others overweight, and can exert epistatic and hypostatic effects. In doing so, as in diabetes mellitus (type 2) there can be a relationship to changes in the IRS1 gene (3931A variant; Gly971Arg), in the gene which codes for the beta3 adrenergic receptor (Trp64Arg variant) and in the gene which codes for the beta2 adrenergic receptor, here especially the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant.

Studies on transgenic mice have shown that the lack of the gene which codes for the IRS-1 protein in contrast leads to a serious delay of body growth (Tamemoto, H., Kaowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., Sekihara, H., Yoshioka, S., Horikoshi, H., Furuta, Y., Ikawa, Y., Kasuga, M., Yazaki, Y., and Aizawa, S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372: 182-186, 1994).

In order to check the correlation of adiposity with the presence of the GNB3-825 nucleotide and the status of the IRS1 gene with respect to the presence of the Gly971Arg variant, the BMI was measured in 20-30 year old healthy males in whom at the same time the status of the GNB3-825 nucleotide and the status of the IRS1 gene were studied with respect to the presence of the Gly971Arg variant. The result is shown in Figure 3.



Figure 3 shows the frequency distribution of the measured values for the BMI. In the presence of the more frequent IRS1 "GG" genotype a significant tendency to increased BMI can be detected with the GNB3-825T allele compared to the GNB-C825 allele. The odds ratio for the 75% quartile compared to the 25% quartile is 2.5. Conversely, the tendency to increased BMI in carriers of the GNB3-825T allele with the simultaneous presence of the IRS1-3931A allele (Gly971Arg variant) is clearly counteracted. This illustrates the interactive effect of GNB3 and IRS1 on the BMI. Thus, the presence of the GNB3-825T allele can reliably correlate with adiposity. It is therefore possible to predict a tendency to adiposity in carriers of this allele, especially those in whom at the same time the IRS1-3931A allele (Gly971Arg variant) is lacking.

825T allele carriers, as is described for example in DE 196 19 362 A1, have an increased risk of developing hypertension. Since overweight and adiposity predispose to a very high degree to cardiovascular conditions, it was studied whether young people with normal blood pressure who carry a 825T allele already have an increased risk for overweight and adiposity. To do this, in 277 young normotensive males the body size and body weight were determined and the blood pressure measured. Overweight is defined as a BMI  $\geq 25.0 \text{ kg/m}^2$  and adiposity as  $\geq 27.0 \text{ kg/m}^2$ . There is a clear relationship between the BMI and the blood pressure values. The frequency of the 825T allele increases linearly from the 1st to the 4th BMI quartile. For homozygotic 825T allele carriers the following risks (odds ratios; OR) can be computed

a) BMI  $\geq 25.0 \text{ kg/m}^2$  versus BMI  $< 25 \text{ kg/m}^2$  (overweight versus normal weight):

OR TT/CC = 2.5 (1.1 - 6.1;  $p = 0.03$ ); OR TC/CC 1.5 (0.8 - 2.6;  $p = 0.2$ )

b) BMI  $> 27 \text{ kg/m}^2$  versus BMI  $< 25 \text{ kg/m}^2$  (adiposity versus normal weight):

OR TT/CC = 5.0 (1.4 - 18.3;  $p = 0.0083$ ) ; OR TC/CC 2.2 (0.8 - 6.3;  $p = 0.13$ )

Thus, a clear relationship arises between the presence of a 825T allele and the tendency to overweight and adiposity. This explains among others to some extent the increased risk of 825T allele carriers for hypercholesteremia, diabetes, hypertension, and coronary heart disease/myocardial infarction.

GNB3 825T allele, BMI and blood pressure values

		BMI Quartile				
<i>GNB3</i>	All	1 < 21.7	2 21.7 - 23.4	3 23.4- 25.0	4 ≥ 25.0	> 27 kg/m <sup>2</sup>
TT	28 (10)	2 (3)	6 (8)	9 (13)	11 (16)	5 (23)
TC	121 (44)	27 (39)	27 (40)	34 (49)	33 (47)	11 (50)
CC	128 (46)	40 (58)	36 (52)	26 (38)	26 (37)	6 (27)
Σ	277	69	69	69	70	22
fT (%)	31.9	22.5	28.3	37.7	39.3	47.7
Age (years)	25.6 (3.4)	24.8 (3.6)	25.6 (3.2)	25.3 (3.4)	26.4 (2.9)	26.5 (2.9)
Size (cm)	180.4 (7.3)	180.8 (6.4)	180.5 (7.4)	180.7 (7.1)	179.6 (7.4)	181.0 (5.9)
Weight (kg)	76.5 (9.8)	67.4 (5.2)	73.1 (6.3)	78.9 (7.1)	86.2 (8.7)	93.5 (6.9)
BP syst (mm Hg)	129.8 (11.1)	126.3 (9.1)	130.2 (9.4)	130 (11.8)	133 (12.9)	135.9 (10.7)
BP diast (mm Hg)	79.1 (7.9)	75.8 (7.9)	79.4 (5.5)	79.7 (7.3)	81.9 (9.2)	84.3 (9.8)

Genotypes are given as n% and continuous variables as averages (standard deviation); fT = 825T allele frequency; BMI (body mass index) is given as kg/m<sup>2</sup>. BP syst - systolic blood pressure; BP diast - diastolic blood pressure.

### 3. Prediction of coronary heart disease and atherosclerosis

It is already known that coronary heart disease can be associated with a G protein dysregulation. In order to verify a relationship between the occurrence of

coronary heart disease and the presence of the GNB3-825T allele, patients with angiographically precluded coronary heart disease, with coronary heart disease (without myocardial infarction), with myocardial infarction and with more than one myocardial infarction were checked for the presence of this allele. The result is shown in Figure 4.

Figure 4 shows the frequency of the GNB3-825T allele in patients with angiographically precluded coronary heart disease (CHD), with (CHD) (without myocardial infarction; MI), with myocardial infarction MI and with more than one myocardial infarction.

A clear rise is apparent in the frequency of the GNB3-825T allele in CHD and MI. The risk for CHD and MI is roughly doubled by the GNB3-825T allele compared to controls without CHD.

Patients with mutation in the IRS-1 protein (3931A allele; Gly971Arg variant) however experience a clear risk reduction by up to 50% in the presence of the GNB3-825 allele or GNB3-825T allele. This change in the IRS-1 protein therefore exerts hypostatic effects, i.e. this variant protects against coronary heart disease.

If we compare patients with CHD to individuals with coronary-angiographically precluded CHD, the odds ratios are as follows:

KHK positive	KHK negative	OR	P - value
GNB3 + IRS1-Status	GNB3 + IRS1-Status		
TT/TC + AG/AA	TT/TC + GG	0.94	not significant
TT/TC + GG	CC + GG	1,4	0,003
TT/TC + GG	CC + AG/AA	2,8	0,002

Thus the correlation between the presence of the GNB3-825T allele and the occurrence of coronary heart disease is proven. Thus it is possible to predict a tendency to coronary heart disease in carriers of this allele, especially those in whom the IRS1-3931A allele (Gly971Arg variant) is lacking.

One special application is the prediction of a coronary heart disease, but also in general of the cardiovascular risk (high blood pressure, etc.) in women with the objective of administering to them controlled, post-menopausal hormone therapy with the female sex hormone in order to reduce cardiovascular risk.

Another application is the prediction of increased risk for myocardial infarctions and sudden cardiac death. This is associated among others with G proteins also controlling ion channels. More accurately, the  $\alpha$  and  $\gamma$  subunits of G proteins control the function of diverse ion channels, for example  $\text{Na}^+$  channels,  $\text{Ca}^{2+}$  channels and  $\text{K}^+$  channels. More accurately matched regulation of these ion channels is of great importance for all electrically excitable tissues, especially for the heart (De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E., Gurnett, C.A. and Campbell, K.P. Direct binding of G protein  $\beta\gamma$  complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385 (6615): 446-450, 1997; Ma, J.Y., Catterall, W.A., and Scheuer, T. Persistent sodium current through brain sodium channels induced by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Neuron* 19(2): 443-452, 1997; Kofuji P., Davidson, N. and Lester, H.A. Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channels are activated by  $\beta\gamma$  subunits and function of heteromultimers. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92: 6542-6546, 1995; Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D.E.  $\beta\gamma$  binds directly to the G protein-gated  $\text{K}^+$  channel,  $\text{I}_{\text{KACH}}$ , *J. Biol. Chem.* 270:29059-29062, 1995).

It has been found that individuals carrying the GNB3-T825 allele have intensified activity of myocardial  $\text{K}^+$  channels. This leads to accelerated repolarization of the cardiac muscle cell and thus to shortened refractory time. These individuals are thus subject to increased risk for cardiac irregularities, especially ventricular tachycardias, extrasystoles, ventricular flutter and ventricular fibrillation. They bear an increased risk for sudden cardiac death also within the framework of acute myocardial infarction.

Finally, carriers of the GNB3-825T allele already at an age from 20 to 30 show clear changes of the properties of the blood vessels. Especially conspicuous are an increased pulse rate, increased cardiac output and increased pulse pressure. These phenomena express an early-onset tendency to increased stiffness of the blood vessels (reduced compliance) as an indicator for atherosclerosis. Genotyping to ascertain the GNB3-825T allele status is thus suited to ascertaining an increased risk of atherosclerosis.

#### 4. Prediction of an increased cholesterol concentration in the blood

It is generally known that individuals with an increased concentration of total cholesterol in the blood can be assigned an increased risk for coronary heart disease and cardiac infarction. A total 232 individuals aged from 18 to 40 years were genotyped with reference to the C825T polymorphism in GNB3 and the total cholesterol in the serum was quantified using standard methods. Subsequently the measured cholesterol concentrations (mg/dl) were divided into quartiles, and the genotype on the GNB3 locus was assigned to the quartiles. The lowest frequency of the 825T allele is found with 23.3% in the 1st quartile, while the frequencies of the 825T allele in quartiles 2-4 is clearly higher.

	Cholesterol Concentration			
	1. Quartile - 163 mg/dl	2. Quartile - 181 mg/dl	3. Quartile - 212 mg /dl	4. Quartile > 212 mg/dl
TT	4 (9)	4 (8)	12 (17)	7 (12)
TC	13 (29)	21 (44)	32 (46)	28 (47)
CC	28 (62)	23 (48)	26 (37)	24 (41)
ft	23,3 %	30,2 %	40,0 %	35,6 %

The numbers correspond to n (%)

If the genotype distribution above the median value ( $> 181$  mg/dl; TT = 19; TC = 60; CC = 50; frequency of the 825T allele: 38%) is compared to that below the median value ( $\leq 181$  mg/dl; TT = 8; TC = 34; CC = 51; frequency of the 825T allele: 26.9%), the risks for cholesterol values in the range above the median are as follows: Odds ratio TT/CC = 2.4 ( $p = 0.053$ ); odds ratios TC/CC = 1.8 ( $p < 0.05$ )

Thus the 825T allele is associated with an increased risk for hypercholesterolemia.

Genotyping on the GNB3 locus therefore offers the possibility for ascertaining an increased risk for hypercholesterolemia with the objective of treating the affected individuals with drugs which can reduce the elevated cholesterol. They include especially inhibitors of the enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A

reductase (HMG-CoA reductase), for example simvastatin, pravastatin, fluvastatin, lovastatin, atorvastatin and other so-called "statins". They also include sitosterine, sitostanol ester (also in foods), fibrates and other substances which reduce cholesterol.

These drugs act as G protein inhibitors and can thus be used therapeutically in diseases which are associated with G protein dysregulation.

## **5. Prediction of increased immune system function**

G proteins and G protein-coupled receptors are also found in all cells of the immune system, especially also in leukocytes. Chemotaxis of cells is mediated mainly by betagamma subunits of heterotrimeric G proteins. Thus the GNB3-825T allele should lead to increased reactivity of the immune system, especially to intensified immune defense.

In fact, neutrophilic granulocytes of carriers of the GNB3-825T allele have increased chemotaxis compared to the peptide fMLP (Figure 5). fMLP is a peptide which is representative of a host of bacterial peptides and which stimulates chemotactic reactions. It is therefore used as a test system for measurement of chemotactic reactions of cells which is well known to one skilled in the art. The fMLP receptor, as is known, activates the pertussis toxin-sensitive G proteins. The statement that granulocytes of carriers of the GNB3-825T allele show intensified fMLP-stimulated chemotaxis is in agreement with the fact that chemotaxis of betagamma subunits is mediated.

This phenomenon can also be detected in other leukocytes as well, for example, lymphocytes. Thus there is a correlation between the GNB3-825T allele and increased chemotaxis of cells of the immune system, for example neutrophilic granulocytes, T lymphocytes, see also 6., or B lymphocytes.

Furthermore, in carriers of the GNB3-825T allele an increased tendency toward proliferation of cells of the immune system, especially also after inoculations, is observed.

Healthy carriers of the GNB3-825T allele show an increased number of leukocytes and CD4-positive T lymphocytes (absolute and percentage) with an increased CD4/CD8 quotient. Figure 6 shows this for an increased number of CD4 lymphocytes. Conversely, carriers of the GNB3-825T allele also show an increased

tendency to developing AIDSs after a HIV infection, see also 7., also in conjunction with the detection of the aforementioned gene change in chemokine receptors, especially a  $\Delta 32$  deletion in the CCR5 receptor or in the area of the promotor of this gene.

Finally, among affected individuals, increased release of immune-modulator substances, hormones and other substances from leukocytes is observed (cytokines, interleukins, growth factors, antibodies, vaso-active substances). In this connection intensified immune defense also arises after transplantation of organs or tissues (kidneys, heart, bone marrow, lungs, skin, liver, etc.) with the danger of transplant rejection. In addition, this results in an increased tendency to autoimmune conditions (rheumatism, ulcerative colitis, Crohn's disease) and to allergic conditions, for example, of the skin, the respiratory passages or other organs (for example, neurodermatitis, hay fever, bronchial asthma). This is also observed in combination with the detection of other gene changes, for example in the beta2-adrenergic receptor, here especially the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant.

## **6. Prediction of increased T lymphocyte function**

T lymphocytes play an important role in the human immune system and mediate the cellular immune response there. Increased activation capacity of T lymphocytes results among others, as already mentioned, in transplanted organs (kidney, liver, heart, lungs, pancreas among others) being subject to an intensified immunological attack. Figure 7 shows as one example the chemotaxis of human T lymphocytes after stimulation with the stromal cell-derived factor 1alpha (SDF 1alpha). A clearly increased chemotactic response of the cells of 825T allele carriers compared to cells of homozygotic C825 allele carriers is apparent.

Similarly, T lymphocytes of 825T allele carriers respond intensely after stimulation with other chemokines, for example RANTES. This behavior is due to the fact that the chemotactic response is controlled essentially by betagamma subunits of heterotrimeric G proteins (Arai, H., Tsou, C.L. and Charo, I.F. Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: Evidence that directed migration is mediated by betagamma dimers released by activation of Galphai-coupled receptors. (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 94(26): 14495-14499, 1997).

The intensified activation of T lymphocytes of 825T allele carriers is also expressed in the increased proliferation of these cells compared to T lymphocytes of homozygotic C825 allele carriers.

Thus, it can be predicted overall that the T lymphocytes of 825T carriers react more strongly to suitable stimulation; this is expressed in increased proliferation and chemotaxis. This behavior is manifested in the form of increased cellular immune defense; this is especially relevant in conditions and surgeries in which there is increased cellular immune defense. Immunological attacks on transplanted organs (kidneys, liver, pancreas, bone marrow, heart, etc.) should be mentioned here in particular. It can thus be predicted that 825T allele carriers tend increasingly to develop acute or chronic rejection reactions against these transplanted organs. This rejection reaction is further strengthened if the transplanted organs originate from a donor who himself is a carrier of the 825T allele. This is due to the fact that organs and tissues of these donors react more strongly to increased immunological attacks by the cells of the recipients in the presence of a 825T allele. Furthermore there is an intensified reaction in acute or chronic virus infections.

#### **7. Prediction of an intensified progression of AIDS**

The multiplication of the HIV virus in T lymphocytes is increased by the activation of the chemokine receptors with action which is mediated via activation of G proteins (Kinter, A., Catanzaro, A., Monaco, J., Ruiz, M., Justement, J., Moir, S., Arthos, J., Oliva, A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Ostrowski, M., Hoxie, J., Offord, R., and Fauci, A.S. CC chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells; role of signal transduction. *Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 95(20): 11880-11885, 1998).

Thus it can be expected that in the T lymphocytes of 825T allele carriers who have increased activation capacity of the G proteins increased virus multiplication takes place after HIV infection. Thus there patients have increased risk of developing AIDS earlier after HIV infection than HIV-positive patients who are homozygotic for the C825 allele on the GNB3 locus. In the following the genotype distribution of 515 HIV-positive patients and of 622 HIV-negative blood donors is shown.



	HIV positive	HIV negative
TT	64	56
TC	235	276
CC	216	290
Total	515	622
T allele frequency	35,2 %	31,2 %

There is a significant difference of the genotype distribution between healthy control probands and HIV-positive individuals (chi square = 4.253, 1 degree of freedom,  $p = 0.0392$ ; chi square test for trend). The risk for the TT versus the CC genotype to be HIV positive is thus 1.5 (1.0 - 2.3;  $p = 0.035$ ; chi square = 4.4).

There is a further accumulation of the 825T allele within the group of HIV positive patients who have developed AIDS and their number of CD4-positive cells has dropped to less than 200 per milliliter of blood.

	HIV positive, CD4 < 200 cells/ $\mu$ l blood	HIV positive, CD4 $\geq$ 200 cells / $\mu$ l blood
TT	40	14
TC	122	89
CC	113	80
Total	275	183
T allele frequency	36,7 %	32 %

Thus, in HIV-positive patients who carry the 825T allele there is an increased risk of developing AIDS. For homozygotic 825 allele carriers the risk is doubled compared to the homozygotic C825 allele carriers (OR TT/CC = 2.0 (1.0 - 3.9;  $p < 0.05$ )).

Genotyping on the GNB3 locus therefore offers the possibility that an increased risk is assigned to the HIV-positive 825T allele carriers for exhibiting an intensified progression of the disease, especially increased multiplication of the AIDS virus occurring. Furthermore, the risk of a more rapid drop of CD4 cells is associated with it.

Within the framework of infection with the HIV virus (sexual transmission), first of all, generally involvement of macrophages, monocytes and Langerhans cells takes place. So-called "M-tropic" "R5" HIV viruses use among others a chemokine receptor of the CCR5 type to enter these cells. Individuals in whom a homozygotic CCR5)32 deletion can be detected have a reduced risk for HIV infection. Individuals in whom the CCR5)32 allele is present in heterozygotic form show a prolonged interval from HIV infection to seroconversion, or delayed progression of the disease. (1. Quillent, C., Oberlin, E., Braun, J., Rousset, D., Gonzales-Canali, G., Metais, P., Montagnier, L., Virelizer, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Beretta, A. HIV-1 resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 351(9095): 14-18, 1998; 2. Mummidi, S., Ahuja, S.S., Gonzales, E., Anderson, S.A., Santiago E.N., Stephan, K.T., Craig, F.E., O'Connell, P., Tryon, V., Clark, R.A., Dolan, M.J., and Ahuja, S.K. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat. Med.* 4(7): 786-793, 1998; 3. Magierowska, M., Theodoru, I., Debre, P., Sanson, F., Autran, B., Riviere, Y., Charron, D. and Costagliola, D. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1 infected individuals. *Blood* 93(3): 936-941, 1999; 4. Michael, N.L., Louie, L.G., Rohrbaugh, A.L., Schultz, K.A., Dayhoff, D.E., Wang, C.E., and Sheppard, H.W. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression [see comments]. *Nat. Med.* 3(10): 1160-1162, 1997; 5. Fauci, A.S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384:529-534, 1996.

In contrast, the presence of one variant in the CCR5 promoter (CCR5P1) intensifies AIDS progression, especially in homozygotic CCR5P1 carriers. (Martin, M.P., Dean, M., Smith, M.W., Winkler, C., Gerrard, B., Michael, N.L., Lee, B., Doms, R.W., Margolick, J., Buchbinder, S., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Hilgartner, M.W., Vlahov, D., O'Brien, S.J., and Carrington, M. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* 282 (5395): 1907-1911, 1998.)

As the disease continues the type of virus changes such that the so-called "T-tropic" (X4) viruses predominate and then attack mainly CD-4-positive T

lymphocytes. These viruses enter via the G protein coupled CXCR4 -chemokine receptor, the natural ligands of which include among others Stromal Cell Derived Factor 1 alpha (SDF-1alpha). A series of chemokines (SDF-1alpha, RANTES, etc.) stimulate the multiplication of T-tropic viruses in CD4-positive T cells, and signal transmission via the pertussis-toxin sensitive G proteins assumes decisive importance: Inhibition of G protein activation by incubation of cells with pertussis toxin reduces the virus replication especially at a low virus number. (Kinter, A., Catanzaro, A., Monaco, J., Ruiz, M., Justment, J., Moir, S., Arthos, J., Oliva, A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Ostrowski, M., Hoxie, J., Offord, R., and Fauci, A.S. CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction. *Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 95(20): 11880-11885, 1998).

Conversely, the conclusion can be drawn that in the presence of a 825T allele which indicates the expression of Gbeta3-s and Gbeta3-s2 and increased activation capacity of G proteins and that the replication of these viruses and thus AIDS progression should be increased.

A change in the gene which codes for SDF-1 (G->A transition at position 801, counted from the start codon) is called SDF1-3'UTR-801G-A or SDF1-3'A. Homozygotes SDF1-3'A show a reduced progression to AIDS. (Winkler, C., Modi, W., Smith, M.W., Nelson, G.W., Wu, X., Carrington, M., Dean, M., Honjo, T., Tashiro, K., Yabe, D., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Jacobson, L.P., Detels, R., Donfield, S., Willoughby, A., Gomperts, E., Vlahov, D., Phair, J., and O'Brien, S.J. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC) [see comments]. *Science* 279 (5349: 389-393, 1998.)

To detect an intensified AIDS progression of 825T allele carriers, 690 HIV-positive homosexuals and heterosexuals (men and women) in whom the HIV virus was transmitted sexually were studied. After genotyping, the following end points of the disease were established which represent one possible definition of developing AIDS:

1. AIDS. Here AIDS is defined as AIDS-defining disease or CD4 cell number < 200. This AIDS definition corresponds to the AIDS definition revised in 1993 from the Center for Disease Control (CDC; Atlanta, USA).
2. CD4 cell number < 200.
3. Minimum CD4 cell number
4. Maximum virus load

Figure 9 shows the instant from the first positive HIV test to the AIDS diagnosis as Kaplan-Meier curves depending on the genotype. Figure 9 shows that homozygotic 825T allele carriers reach the end point AIDS according to the 1993 CDC definition significantly earlier than homozygotic or heterozygotic 825C allele carriers.

Figure 10 shows the interval between the first positive HIV tests and the drop of the CD4 cell number below 200. Here the time behavior for homozygotic 825T allele carriers compared to homozygotic and heterozygotic C825 allele carriers is likewise drastically accelerated.

Figure 11 shows the time behavior from the first positive HIV test and the individually lowest CD4 cell number. Here likewise a significant acceleration arises in homozygotic 825T allele carriers compared to homozygotic and heterozygotic C825 allele carriers.

Figure 12 shows the interval between the first positive HIV test and the maximum virus load. In turn it is shown that the 825T allele carriers have a clearly increased risk of having a maximum virus load earlier than homozygotic or heterozygotic C825 allele carriers.

### **7.1 Correlation to the CCR5 allele status**

In the following, the CCR5 allele status was also studied with reference to the presence of the  $\Delta 32$  deletion. The relative risks (RH) shown in the following table are shown together with the 95% confidence intervals (95% CI).

Without considering the genetic background, the risk for AIDS or the drop of the CD4 cell level < 200 is roughly doubled for homozygotic 825T allele carriers compared to homozygotic and heterozygotic C825 allele carriers. Ignoring the genetic background the risk for CCR5 $\Delta 32$  allele carriers to reach a CD4 cell number < 200 is

increased by a factor of 1.4 in the observation intervals. In the following the effect of the 825T allele is studied separately for the CCR5 wild type and for CCR5 $\Delta$ 32 wild type. In the presence of the homozygotic CCR5 wild type the risk for AIDS or a CD4 cell number < 200 is roughly 1.6 for homozygotic 825T allele carriers compared to heterozygotic C825 allele carriers.

In the presence of the CCR5 $\Delta$ 32 genotype which was described originally as protective, for homozygotic 825T allele carriers there is a further increase of the risk by almost 3-fold compared to heterozygotic C825 allele carriers.

GNB3 825 genotype status and CCR5 genotype status and AIDS progression  
COX Proportional Hazard Model:

Constant	Target Quantity	Gene Status studied	RH	95% CI
nothing	AIDS	GNB3 TT versus TC+CC	1.9	(1.4-2.6)
	CD4 < 200	"	1.9	(1.4-2.6)
	CD4 min	"	1.5	(1.2-2.0)
	PCR max	"	1.5	(1.2-2.0)
nothing	AIDS	CCR5 WT versus CCR5 $\Delta$ 32	ns	
	CD4 < 200	"	1.4	(1.0-1.9)
	CD4 min	"	ns	
	PCR max	"	ns	
CCR 5 = WT	AIDS	GNB3 TT versus TC+CC	1.6	(1.1-2.3)
	CD4 < 200	"	1.6	(1.1-2.3)
	CD4 min	"	1.4	(1.1-1.9)
	PCR max	"	1.4	(1.0-1.9)
CCR5 $\Delta$ 32	AIDS	GNB3 TT versus TC + CC	2.7	(1.3 - 5.5)
	CD4 < 200	"	3.0	(1.5-6.3)
	CD4 min	"	2.1	(1.1-3.8)
	PCR max	"	1.9	(1.0-3.4)

RH = relative hazard; 95% CI = 95% confidence interval; GNB3 = G protein beta3 subunit; TT - homozygote for 825T; TC and CC, heterozygotic or homozygotic for C825; CCR5 WT - CCR5 wild type (absence of  $\Delta$ 32 deletion); PCR max, time

interval to maximum virus load; AIDS, time interval to advent of AIDS according to 1993 CDC definition; ns - not significant.

Therefore, in summary the following can be stated for HIV-positive patients:

1. Homozygosis for the 825T allele in GNB3 increases the risk for the progression to AIDS.
2. This effect is further intensified in the presence of the CCR5 $\Delta$ 32 genotypes.

### **8. Prediction of increased CO<sup>2</sup> or hypoxia tolerance**

As is recognized, G proteins are also involved in the regulation of the respiratory drive by hypoxia or hypercapnia (Prabhakar, N.R., Kou, Y.R., and Kumar. G.K. G proteins in carotid body chemoreception. *Biol. Signals* 4:271-276, 1995; Cachero, T.G., Rocher, A. Rigual, R.J. and Gonzalez, C. Effects of fluoride and cholera and pertussis toxins on sensory transduction in the carotid body. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 269:C1271-C1279, 1995).

It has been found that probands who carry the GNB3-825T allele show a reduced drive of respiration (respiratory minute volume) when the inspired pCO<sub>2</sub> is increased and thus increased CO<sub>2</sub> tolerance. Increased CO<sub>2</sub> tolerance thus represents an increased risk especially for those individuals in whose working environment CO<sub>2</sub> accumulation can occur. Reduced CO<sub>2</sub> sensitivity thus entails an increased risk for spontaneously occurring unconsciousness, for example, within the framework of the narcotic effect of CO<sub>2</sub>. Especially affected here are professional divers, tunnel workers, pilots, submariners, etc. With the detection of the GNB3-825T allele these individuals can be identified and warned so that the accident risk is reduced.

### **9. Prediction of osteoporosis**

Generalized osteoporosis represents one of the most frequent diseases of post-menopausal women and entails an increased risk of bone fractures. G proteins are significantly involved in processes which lead to rebuilding bone. The altered activation capacity of G proteins is thus heavily involved in the osteoporosis risk (May, L.G. and Gay, C.V. Multiple G protein involvement in parathyroid hormone regulation of acid production by osteoclasts. *J. Cell Biochem* 64(i): 161-170; 1997; Gordeladze, J.O., Lund, H.W., Jablonski, G., and Bruland, O.S. Diverse expression of

G proteins in human sarcoma cell lines with different osteogenic potential: Evidence for the involvement of G<sub>12</sub> in cell proliferation. *J. Cell Biochem.* 60:95-106, 1996).

In this case as well female carriers of the GNB3-825T allele show an increased risk of developing osteoporosis.

#### **10. Prediction of Alzheimer's disease**

Altered activation capacity of G proteins and altered regulation of K<sup>+</sup> channels have been described in patients with Alzheimer's disease. Furthermore, reduced activation of the adenylyl cyclase after stimulation of beta-adrenergic receptors was described. These phenomena can be attributed to increased activation capacity of pertussis toxin-sensitive G proteins with expression of the Gbeta3s splice variant (Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E. and Nishimoto, I. Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J. Biol. Chem.* 270: 4205-4208, 1995; Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Murayama, Y., and Ogata, E. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G<sub>0</sub>. *Nature* 362:75-79, 1993; Etcheberrigaray, R., Ito, E., Oka, K., Tofel-Grehl, B., Gibson, G.E. and Alkon, D.L. Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8209-8213, 1993; Yamatsuji, T., Matsui, T., Okamoto, T., Komatsuzaki, K., Takeda, S., Fukumoto, H., Iwatsubo, T., Suzuki, N., Asami-Odaka, A., Ireland, S., Kinane, T.B., Giambarella, U., and Nishimoto, I. G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. *Science* 272:1349-1352, 1996; Cowburn, R.F. Wiehager, B., Ravid, R., and Winblad, B. Acetylcholine muscarinic M2 receptor stimulated [<sup>35</sup>S]GTPgammaS binding shows regional selective changes in Alzheimer's disease postmortem brain. *Neurodegeneration* 5:19-26, 1996).

Consequently, carriers of the GNB3-825T allele have an increased risk of developing Alzheimer's disease. At the same time the early-onset atherosclerosis described under 3 which is observed in carriers of the GNB3-825T allele contributes to the formation of Alzheimer's disease.

### 11. Prediction of erectile dysfunction (impotence)

The erection of the penis after sexual stimulation is caused by increased inflow of blood with simultaneously reduced outflow of blood. The mechanisms which are necessary for the increased inflow of blood comprise the actions of hormones, the action of which is mediated via G proteins.

A total of 63 males with proven erectile dysfunction and 614 healthy male controls were genotyped on the GNB locus 825 locus:

	Erectile Dysfunction	control males
TT	2 (3)	55 (9)
TC	20 (32)	275 (45)
CC	41 (65)	284 (46)
Total	63	614
FT (%)	19,0 %	31,4 %

The figures are n %.

The distribution of genotypes is significantly different (chi-square = 8.7; 2 degrees of freedom,  $p = 0.01$ ), in the males with erectile dysfunction a drastic reduction of the frequency of the 825T allele to 19% being conspicuous. In this way the following risks (odds ratios; OR) can be computed for erectile dysfunction in comparison to a randomized control group:

CC/TT, OR = 4.0 (95% CI: 0.9 - 16.9;  $p = 0.04$ )

CC/TC, OR = 2.0 (95% CI: 1.1 - 3.5;  $p = 0.01$ )

Thus homozygotic C825 allele carriers compared to homozygotic 825T allele carriers have 4 times the risk, compared to heterozygotic 825T allele carriers twice the risk of developing an erectile dysfunction. Furthermore, the risk for heterozygotic 825T allele carriers is roughly doubled compared to homozygotic 825T allele carriers.

### 12. Prediction of thyroid gland dysfunctions

Carriers of the 825T allele often have thyroid gland dysfunctions and must be treated with thyroid hormones (for example thyroxin).



### **13. Prediction of increased pregnancy risk**

Hypertension, edema formation and the so-called "HELLP syndrome" entail a serious danger for pregnancy, both for the life of the mother and also the life of the fetus. It was found that in carriers of the 825T allele who develop gestational hypertension (gestosis, preeclampsia) there is a high risk of premature birth (delivery before the 37th week of pregnancy or birth weight of the child less than 2500 g, see also 14.), for these children in addition there being the risk for stillbirth or post-delivery death. At the same time in women who are carriers of the 825T allele and who are suffering from gestosis, the risk of spontaneous abortion (habitual abortion) increases.

Detection of the 825T allele is therefore suited for predicting an increased risk of death for the unborn child of pregnant mothers with gestosis.

### **14. Prediction of low birth weight**

There is recognized to be an empirical relationship which describes an inverse relation between birth weight and the risk of suffering from overweight, hypertension or type-2 diabetes over the lifespan. Here it has been described that individuals with very low birth weight tend especially to these conditions. It was therefore studied whether for children with the 825T allele there is an increased risk of being born with a low birth weight. A low birth weight has been defined as the weight which after dividing all weights is in the lowest quartile of the overall distribution. If we compare the distribution of genotypes on the GNB3 locus between the 1st quartile with the combined quartiles 2-4, for homozygotic 825T allele carriers compared to homozygotic C825 allele carriers the risk of low birth weight is increased by a factor of six (95% CI = 1.3 - 28.6;  $p < 0.05$ ) (quartile 1 versus quartiles 2-4) and for heterozygotic 825T allele carriers the risk is 2.4 times higher (95 % CI = 0.7 - 7.9)

#### G beta3 gene 825T allele and birth weight

	1. Quartile	2. Quartile	3. Quartile	4. Quartile	2.-4.Quartile
birth weight	-3130 g	-3430 g	-3750 g	> 3750 g	all > 3130 g
TT	5	1	2	2	5
TC	11	9	11	7	27
CC	5	11	8	11	30
Total	21	21	21	20	62
% T	50	26	36	27,5	30

After genotyping on the GNB3 locus therefore an increased risk is assigned to 825T allele carriers for being born with low birth weight and being subjected to intrauterine growth retardation.

Another subject of this invention is the pharmacogenetics of the GNB3-825T allele, i.e. the possibility of predicting the action of pharmaceuticals using the genotype.

Most pharmaceuticals (hormones, receptor agonists) exert their effect via receptors which couple to G proteins. Antagonists block the hormone receptor interaction.

It has now been ascertained that genotyping on the GNB 3 locus is suitable for predicting the effectiveness of pharmaceuticals using the genotype. This relates to responsivity in vivo to hormones, transmitters (also neurotransmitters) or pharmaceuticals which activate those G protein heterotrimers which contain the G protein subunits Gbeta3 and Gbeta3s. This goes along with the prediction of reduced effectiveness of hormones, neurotransmitters or pharmaceuticals which stimulate the G-protein subunit, for example beta adrenergic agonists. This also applies with the simultaneous use of detection of the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant in the beta2 adrenergic receptor. The presence of the GNB3-825T allele therefore shows altered pharmacogenetics and should be considered in the specific choice of a form of therapy (pharmacological or non-pharmacological) and in the dosages of

pharmaceuticals or hormones in hypertension, diabetes mellitus, coronary heart disease, acute myocardial infarction with or without cardiac irregularities, cardiac irregularities, transplant rejection etc.

In this connection the presence of the GNB3-825T allele however also allows the prediction of the effectiveness of administering erythropoietin on blood cell formation and the prediction of the occurrence of hypertension during this therapy as well as the prediction of the danger of developing hypertension during immunosuppressive therapy (for example, with cyclosporin).

Likewise in this connection the effectiveness of substances for treatment and prevention of migraine attacks (agonists on the serotonin receptor) can be predicted.

This is demonstrated on the following example. An alpha2 adrenergic agonist (BHT 933) was applied intracoronary in the probands; it leads to contraction of coronary vessels. This effect was quantified via the flow change through these sections of the vessels. As Figure 8 shows, an intensified reduction of coronary blood flow in carriers of the GNB3-825T allele is observed, regardless of whether they are suffering from a coronary heart disease (CHD). This means that in carriers of the GNB3-825T allele the intensification of the action of these pharmaceuticals can be predicted.

Another subject of this invention is production of pharmaceuticals which inhibit the Gbeta3s splice variant.

Fundamentally it is possible to synthesize chemicals which inhibit the function of the Gbeta3s protein by their leading for example to accelerated decomposition of the protein or by inhibiting its interaction and combination with alpha and gamma subunits of the human G protein. To identify these substances a screening system is necessary. To do this the expression of the Gbeta3s subunit alone or in combination with different Galpha and Gbeta subunits in Sf9 insect cells, in other cells suitable for transfection, or the use of purified Galpha and Ggamma3s subunits in a reconstitution system in the presence or absence of G-protein-coupled receptor is

suitable. By means of these systems for example the action of chemicals on the receptor-mediated binding of GTP to the Galpha subunits can be studied, by which ultimately chemicals can be identified which inhibit the function of the Gbeta3s subunit. One such test system can fundamentally also be used as a "high-throughput screening system" for testing of a host of substances.

#### Second splice variant of the Gbeta3s-3 protein (Gbeta3s-2)

Another splice variant of the Gbeta3s subunit of heterotrimeric G proteins of man which is called Gbeta3s-2 was found by further analyses of the GNB3 gene.

To do this, the mRNA was extracted using standard methods from neutrophilic granulocytes of individuals who are homozygotic for the C825 in GNB3 (CC genotype) or who are heterozygotic for the C825T polymorphism (TC genotype) and are transcribed by means of the reverse transcriptase reaction in cDNA. The cDNA which codes for Gbeta3 was amplified by means of a polymerase chain reaction. Here the following primers were used:

Sense: 5' - gcc gtc aga ctt tca ctg gc - 3'

Antisense: 5' - tgt tca ctg cct tcc act tcc - 3'

The location of these primers is chosen such that there is a primer in the area of exon 9 of the gene, while the other primer is in exon 11 in the 3' untranslated area.

The following PCR conditions were used: 5 min: 94°C - 1 min., 60°C - 45 sec., 72°C - 1 min.; finally: 72°C - 7 min.

PCR products were separated in a 2.5% agarose gel in 0.5 x TBE plus 0.1 microns/ml ethidium bromide and visualized under UV light. pBR322 DNA/Alu I was used as the size marker.

As becomes apparent in Figure 13, in cells of individuals who carry a T allele on position 825 of the cDNA (heterozygotic or homozygotic) another specific shortened RT-PCR product is detected.

It has been found that the shortened PCR product represents a new splice variant of the Gbeta3 gene. A representation of it can be found in Appendix 3. The complete sequence of the cDNA is shown, as was described earlier by Levine et al. (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T. Jr., Helman, L.J. and Ahn, T.G. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit

polypeptide. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 87(6), 2329-2333 (1990)). Here the numbering originally stipulated by the authors is retained so that the start codon ATG is assigned to position 6 of the nucleic sequence.

The previously described deletion of nucleotides 504 - 626 (corresponding to 498 - 620 if numbering begins with the start codon ATG) which is caused by alternative splicing of the gene in carriers of a 825T allele is described. In Appendix 3 this area is called "deletion in Gbeta3s" (Siffert, W., Rosskopf, D., Siffert, G., Horsthemke, B. Association of the human G protein beta3 subunit variant with hypertension Nat. Genet. 18(1):45-48, 1998). The deletion which has now been described again occurs in exon 10 of the gene, includes the previously described C825T polymorphism, and comprises 129 nucleotides; this corresponds on the protein plane to a loss of 43 amino acids (in Appendix 3 called "deletion in Gbeta3s-2). The open read frame is preserved. The exact location of the deletion cannot be unambiguously ascertained due to repetitive sequences. The nucleotides 708 - 836 or the nucleotides 712 - 840 can be omitted. If the ATG of the start codon is fixed with 1, the nucleotides 702- 830 or 706 - 834 are omitted. Knowledge of the exact location of this deletion is insignificant for the new cDNA and amino acid sequences of Gbeta3s-2. Appendix 3 furthermore shows the polymorphism positions C825T and C1423T. Due to the use of the original numbering according to Levine et al. in Appendix 3 the C825T polymorphism is at position 831 and C1243T polymorphism at position 1249. A new T657A polymorphism which occurs in roughly 1-3% of Caucasians was found by further sequencing.

The new cDNA sequence of the Gbeta3s-2 is shown combined in Appendix 4 jointly with the amino acid sequence.

G protein beta subunits belong to the family of the WD repeat proteins. These beta subunits are highly conserved. It is known that these beta subunits form a spatial structure which is similar to a propeller with seven propeller blades (Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D.C., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. Crystal structure of a G protein betagamma dimer at 2.1A resolution. Nature 379:369-374, 1996). Based on the deletion which occurs in Gbeta3s-2 it can be predicted that a new beta subunit is formed which, analogously to Gbeta3-s, has only six instead of seven such rotor

blades. This is shown schematically in Figure 14, at the same time the deletion found previously in Gbeta3-s being shown.

First of all, it was studied whether G protein heterotrimers which contain Gbeta3s-2 are functionally active. As described earlier, the Sf9 insect cell system was used for this purpose (Siffert, W., Roszkopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E.; Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., and Horsthemke, B. Association of a human G protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat. Genet.* 18(1): 45-48, 1998). The cells were transfected with Galphai2, Ggamma12 and the m2-muscarinic acetylcholine receptor. The bonding of 35S-GTPgammaS to permeabilized cells was quantified after stimulation with carbachol (100 microM). Here the specific incorporation of 35S-GTPgammaS is a measure of the activation of G protein alpha subunits. As shown in Figure 15, in the absence of a beta subunit only little G protein activation is observed. After transfection of Gbeta3 or Gbeta3s, G protein activation is clearly intensified, Gbeta3s being more potent than Gbeta3. The new splice variant Gbeta3s-2 leads to the strongest potentiation of G protein activation caused by the agonist carbachol. Thus it is shown at the same time that Gbeta3s-2 in spite of the deletion of one propeller blade is functionally active and even leads to intensified activation of G proteins. Thus, earlier findings are also explained which have demonstrated the intensified activation capacity of G proteins in cells of individuals carrying the 825T allele (Siffert, W., Roszkopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E.; Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., and Horsthemke, B. Association of a human G protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat. Genet.* 18(1): 45-48, 1998. Pietruck, F., Moritz, A., Montemurro, M., Sell, A., Busch, S., Roszkopf, D., Virchow, S., Esche, H., Brockmeyer, N., Jakobs, K.H., and Siffert, W. Selectively enhanced cellular signalling by G<sub>i</sub> proteins in essential hypertension. Galpha<sub>i2</sub>, Galpha<sub>i3</sub>, G<sub>s1</sub>, and G<sub>s2</sub> are not mutated. *Circ. Res.* 79:974-983, 1996. Siffert, W., Roszkopf, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg-Stasch, S., Kettler, N., Hartung, K., Bechmann, S., and Jakobs, K.H. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J. Clin. Invest.* 96:759-766, 1995. Virchow, S., Ansorge, N., Ruebben, H., Wiffert, G., and Siffert, W. Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human

neutrophils from individuals carrying out the G protein beta3 subunit 825T-allele. FEBS Lett. 436(2): 155-158, 1998).

It is generally known that betagamma subunits of heterotrimeric G proteins can stimulate different isoforms of the phospholipase Cbeta. This enzyme splits phospholipids, for example phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate into the "second messenger" molecules inositol-1,4,5 triphosphate (IP3) and 1,2-diacylglycerol (DAG), IP3 causes release of calcium ions from intracellular reservoirs, while DAG activates different isoforms of the protein kinase C. Activation of phospholipase C is thus an important step in cell activation. It was examined whether betagamma subunits which contain Gbeta3s-2 can activate the phospholipase Cbeta 3 (PLCbeta3). To do this the COS-7 cell system was used which is often used in the generally accessible literature for transient transfection of proteins. These cells were transfected with the PLCbeta3, Ggamma12 and different Gbeta subunits. The cells were pretreated with radioactively tagged [3H] inositol. The formation of inositol phosphates (IP) was quantified using standard methods, the amount of the 1P formed constituting a measure of the activation of the PLC. As is shown in Figure 16, betagamma dimers which contain Gbeta3, Gbeta3s, or Gbeta3s-2 can activate PLCbeta3. Likewise, activation of PLCbeta3 after transfection of Gbeta1 is shown for comparison.

These studies prove that Gbeta3s-2 is able to cause stimulation of typical cellular effector systems. It is thus a fully functional protein, and an intensified cellular activation capacity can be assigned to individuals who carry the 825T allele and who express this protein.

The discovered splice variant Gbeta3s-2 can be used to advantage by the corresponding proteins being produced with the objective of developing or testing chemicals which inhibit the protein or prevent its interaction with the G protein alpha or gamma subunits.

Especially in the area of therapy it is a good idea to transfect cells or tissue stably or transiently in the knowledge of the discovered splice variant. Likewise, for therapeutic purposes the Gbeta3s-2 splice variant can be expressed in human or animal cells or tissues.

Another use of the nucleic acid sequence of the cDNA shown in Appendix 3 consists in developing gene probes for detection of the nucleic acid sequence.

Furthermore, an antisense construct (oligonucleotide) can be introduced into cells and tissues with the objective of suppressing the synthesis of the Gbeta3s-2 splice variant.

Antisense constructs can also be introduced into these cells or tissues with the aid of different vectors (viruses which have been altered by genetic engineering).



## Claims

1. Nucleic acid sequence coding for the Gbeta3 subunit of the human G protein with the sequence described in Appendix 1.

2. Nucleic acid sequence coding for the Gbeta3 subunit of the human G protein with the sequence described in Appendix 2.

3. Use of a gene change in the gene for the Gbeta3 subunit of the human G protein, at position 825 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine and/or at position 1429 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine, for determination of the risk of developing a disease which is associated with G protein dysregulation.

4. Use as claimed in claim 3 for determining the risk of developing diabetes mellitus type 2, overweight and adiposity, hypercholesterolemia, coronary heart disease, myocardial infarction, sudden cardiac death, osteoporosis, atherosclerosis, neurodegenerative or cerebrovascular conditions, especially Alzheimer's disease, which is based on the increased reactivity of the immune system and/or not developing an erectile dysfunction.

5. Use of a gene change in the gene for the Gbeta3 subunit of the human G protein, at position 825 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine and/or at position 1429 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine, for predicting the risk of women for developing a cardiovascular condition, especially high blood pressure or coronary heart disease or for preparing a specific hormone therapy in order to reduce the cardiovascular risk.

6. Process for determining the risk of a proband for developing a disease associated with G protein dysregulation in which the gene sequence for the Gbeta3 subunit of the human G protein of the proband compares with the gene sequence in Appendix 1 and/or Appendix 2 and for the case in which it agrees with the gene sequence in Appendix 2 in position 825 and/or in position 1429, assigns an increased disease risk to the proband.

7. Process as claimed in claim 6, wherein to determine the risk of developing diabetes mellitus type 2, gene changes in the IRS1 gene (3931A variant; Gly971Arg), in the IRS2 gene, in the gene which codes for the p85 alpha regulatory subunit of PI3 kinase (1020 G -> A; codon 326 Met -> Ile), in the gene which codes for the beta3 adrenergic receptor (Trp64Arg), in the gene which codes for the beta2-adrenergic receptor (here especially the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant), in the gene which codes for the tumor necrosis factor alpha and/or in the gene which codes for leptine or the leptine receptor, are studied at the same time.

8. Process as claimed in claim 6, wherein to determine the risk of developing overweight and adiposity, gene changes in the IRS1 gene (3931A variant; Gly971Arg), in the gene which codes for the beta3 adrenergic receptor (Trp64Arg), and/or in the gene which codes for the beta2-adrenergic receptor (here especially the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant) are studied at the same time.

9. Process as claimed in claim 6, wherein to determine the risk of developing coronary heart disease and/or myocardial infarction, gene changes in the IRS1 gene (3931A variant; Gly971Arg) are studied at the same time.

10. Process as claimed in claim 6, wherein to determine the risk of developing diseases which are associated with increased reactivity of the immune system, gene changes in the beta2-adrenergic receptor (here especially the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant) are studied at the same time.

11. Process as claimed in claim 6, wherein an increased risk of developing AIDS is assigned to homozygotic HIV-positive probands.

12. Process as claimed in claim 11, wherein to determine the risk of developing AIDS, gene changes in the CCR5 gene are studied at the same time and wherein a further increased risk of developing AIDS is assigned to the homozygotic or heterozygotic probands for the CCR5Δ32 polymorphism.

13. Process as claimed in claim 11 or 12, wherein to determine the risk of developing AIDS, gene changes in the CCR5 gene are studied at the same time and wherein a further increased risk of developing AIDS is assigned to the probands which carry the CCR5P1 allele.

14. Process as claimed in claim 11, wherein to determine the risk of developing AIDS, studies are done at the same time with respect to the SDF1-3'UTR-801G-A polymorphism and wherein a further increased risk of developing AIDS is assigned to the probands which carry the SDF1-3'A allele.

15. Use of a gene change in the gene for the Gbeta3 subunit of the human G protein, at position 825 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine and/or at position 1429 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine, for identifying individuals with increased CO<sub>2</sub> or hypoxia tolerance.

16. Use of a gene change in the gene for the Gbeta3 subunit of the human G protein, at position 825 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine and/or at position 1429 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine, for predicting the responsivity of a proband in vivo to hormones, transmitters (also neurotransmitters) or pharmaceuticals which activate those G protein heterotrimers which contain the G protein subunits Gbeta3 and Gbeta3s and/or which stimulate the G protein subunit GalphaS.

17. Use as claimed in claim 16 for predicting the responsivity of a proband, at the same time the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant being detected in the beta2 adrenergic receptor.

18. Use as claimed in claim 16 or 17 for specific choice of a pharmacological or non-pharmacological form of treatment and the dosages of pharmaceuticals or hormones in hypertension, diabetes mellitus, coronary heart disease, acute myocardial infarction with or without cardiac irregularities, cardiac irregularities, and transplant rejection.

19. Use as claimed in claim 16 or 17, for prediction of the effectiveness of administering erythropoietin on blood cell formation and/or the prediction of the formation of hypertension during this therapy.

20. Use as claimed in claim 16 or 17, for prediction of the danger of developing hypertension during immunosuppressive therapy, especially with cyclosporin.

21. Use as claimed in claim 16 or 17 for prediction of the effectiveness of substances for treatment and prevention of a migraine attack.

22. Use of a nucleic acid sequence which is complementary to the nucleic acid sequence as claimed in claim 1 or 2, for producing an antisense pharmaceutical for treatment or prevention of diseases.

23. Use of a protein of the Gbeta3s subunit of the human G protein in recombined systems or after transfection in suitable cell lines for identifying chemicals which inhibit the function of Gbeta3s.

24. Beta-3 subunit of a human G protein which has at most six WD repeat motives, wherein the Gbeta3s subunit has the amino acid sequence shown in Appendix 4.

25. Nucleic acid sequence coding for a protein as claimed in claim 24.

26. Nucleic acid sequence as claimed in claim 25 with the sequence shown in Appendix 3.

27. Process for producing a protein as claimed in one of claims 24 to 26, wherein a nucleic acid sequence as claimed in one of claims 25 or 26 is optionally provided with suitable regulation signals and is induced to expression in a host organism.

28. Process as claimed in claim 27, expression taking place in immune cells of immune-deficient, especially HIV-positive individuals.

29. Process as claimed in claim 27, expression taking place in human body cells.

30. Use of a nucleic acid sequence as claimed in claim 25 or 26 for producing a pharmaceutical for treatment of diseases which are associated with G protein dysregulation.

31. Use of a nucleic acid sequence as claimed in claim 25 or 26 for producing transgenic animals.

32. Use of a nucleic acid sequence which is complementary to the nucleic acid sequence as claimed in claim 25 or 26, for producing an antisense pharmaceutical for treatment or prevention of diseases which are associated with G protein dysregulation.

33. Use of a protein as claimed in claim 24 for producing antibodies directed against this protein

Fig. 1

The expression of G $\beta$ 3 and G $\beta$ 3-s in the COS-7 cells. The activability of G proteins is quantified by the incorporation of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S. The G-proteins are stimulated with the peptide mastoparan-7 (Mas-7).

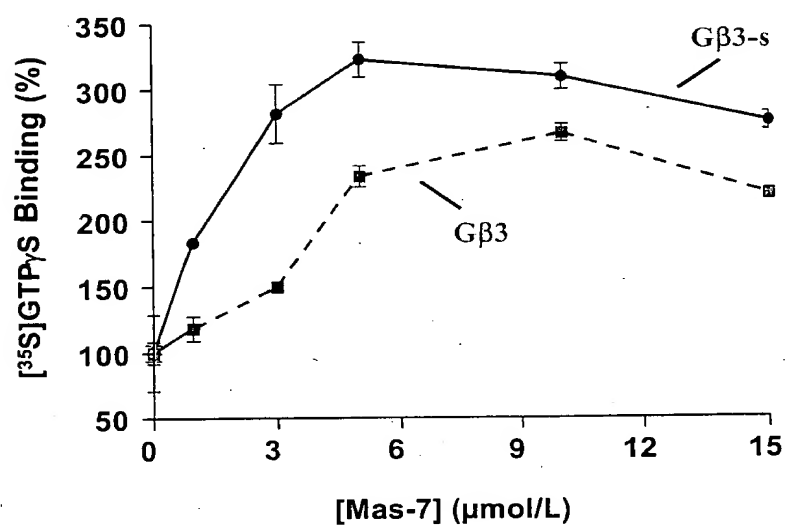


Fig. 2

Expression of G $\beta$ 3 and G $\beta$ 3-s in Sf9 insect cells whereby G $\alpha$ i3, G $\gamma$ 5 and m2-muscarinic receptor are simultaneously expressed. The activability of G proteins is quantified by the incorporation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S. The G proteins are stimulated with carbachol.

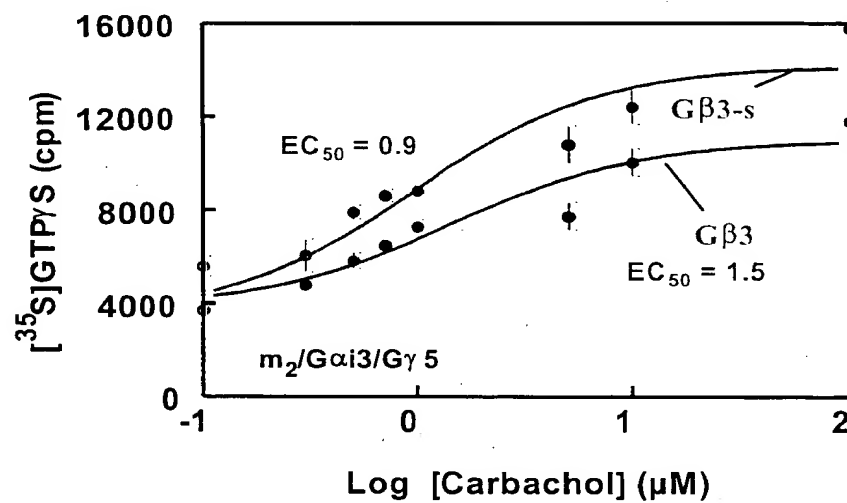


Fig. 3

Regulation of the body mass index of men aged 20-30 depending on the GNB3- and IRS1-genotype. Individuals with IRS1 GG-genotype bearing the GNB3 825T-allele show an increased BMI. This effect is countered by the IRS1-allele.

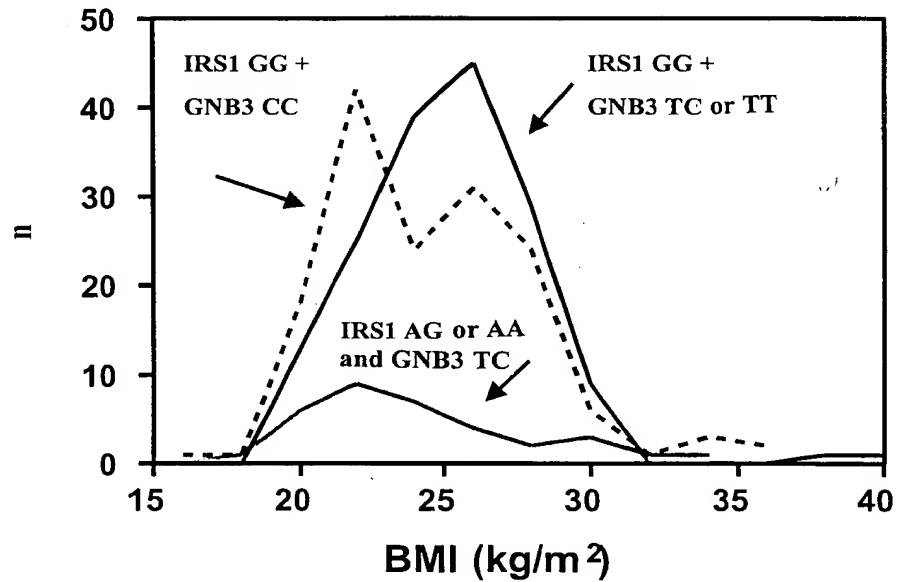


Fig.4

Frequency of the GNB3 825 T-allele at coronary heart disease (CHD) and myocardial infarction.

No CHD = angiographically precluded CHD

CHD = coronary heart disease without myocardial infarction

MI = coronary heart disease with myocardial infarction

MI > 1 coronary heart disease with more than one anamnestic myocardial infarction.

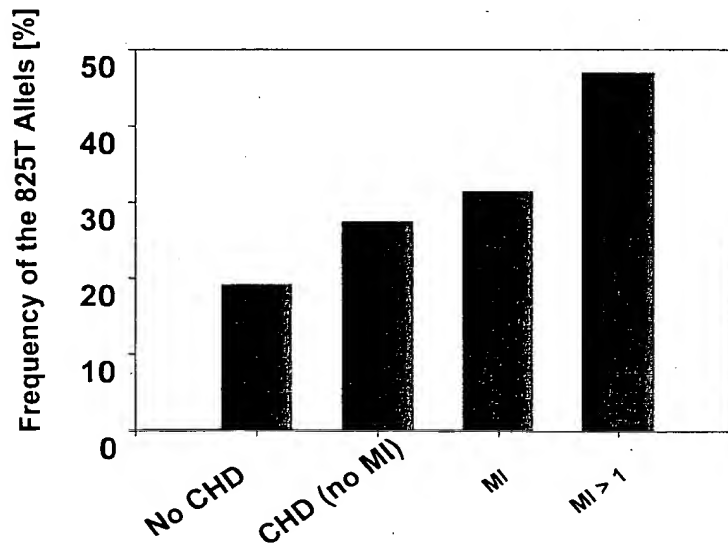




Fig.5

FMLP - stimulated chemotaxis at human neutrophilic granulocytes depending on the GNB3 genotype.

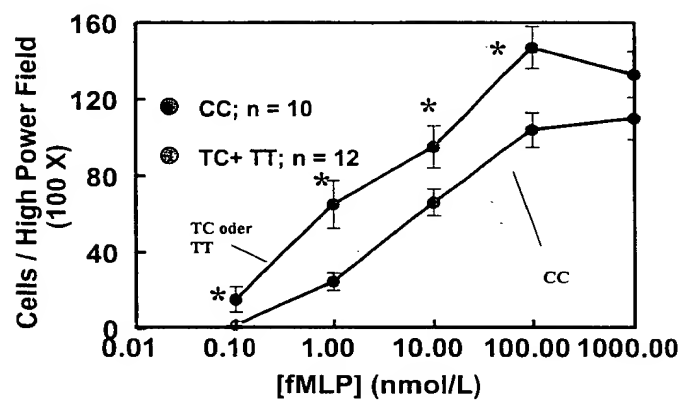


Fig. 6

CD 4 Count (number of CD4-positive T lymphocytes /  $\mu$ l) at male, healthy blood donors (non-smokers) depending on the GNB3 - genotype.

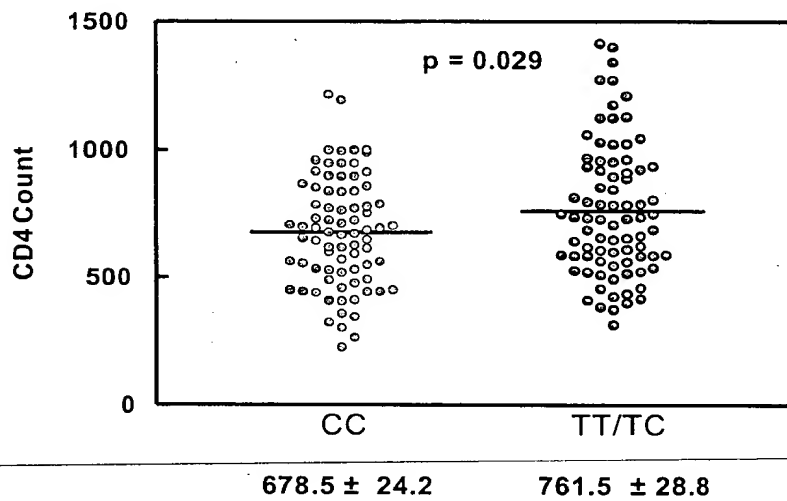


Fig. 7

CD 4 Count(number of CD4-positive T-lymphocytes /  $\mu$ l) at male HIV positive patients depending on the GNB3 - genotype.

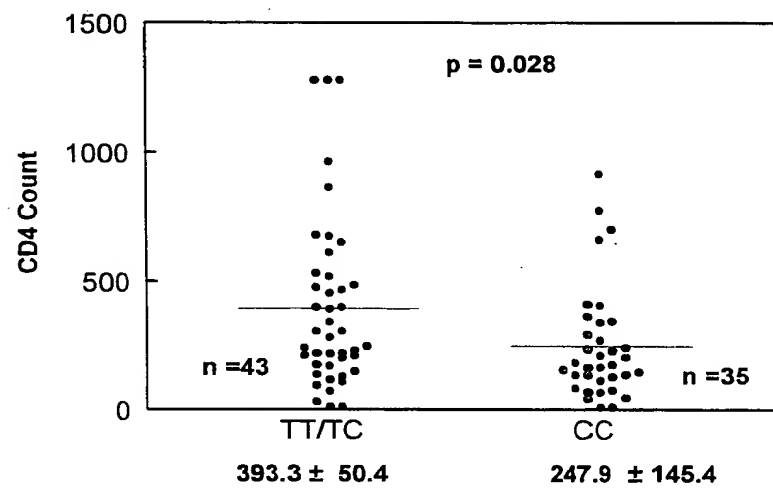


Fig. 8

An example for the chemotaxis of human T lymphocytes after stimulation with the stromal cell-derived factor 1alpha (SDF 1alpha).

(\* = TT)

### Enhanced Chemotaxis of T-Lymphocytes from 825T Allele Carriers

---

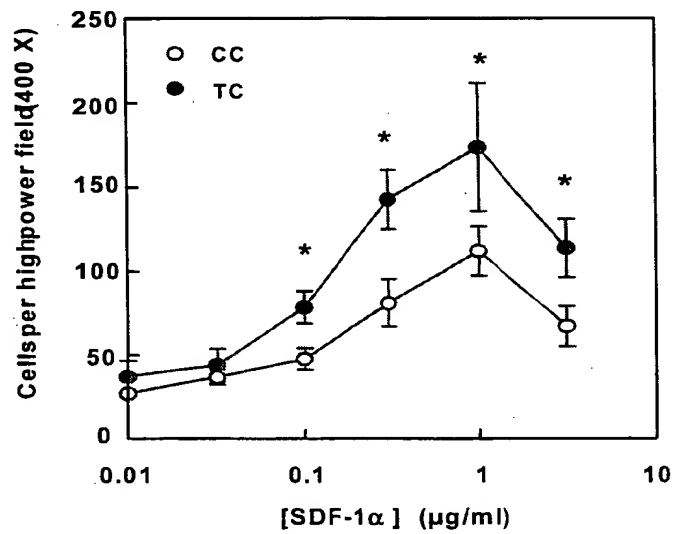


Fig. 9

Effect of an intracoronary application of the alpha2 adrenergic agonist BHT 933 on the coronary blood flow depending on the GNB3 genotype.

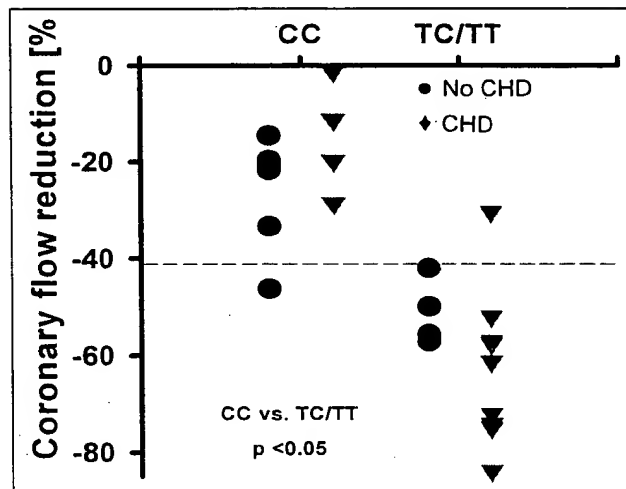


Fig. 10

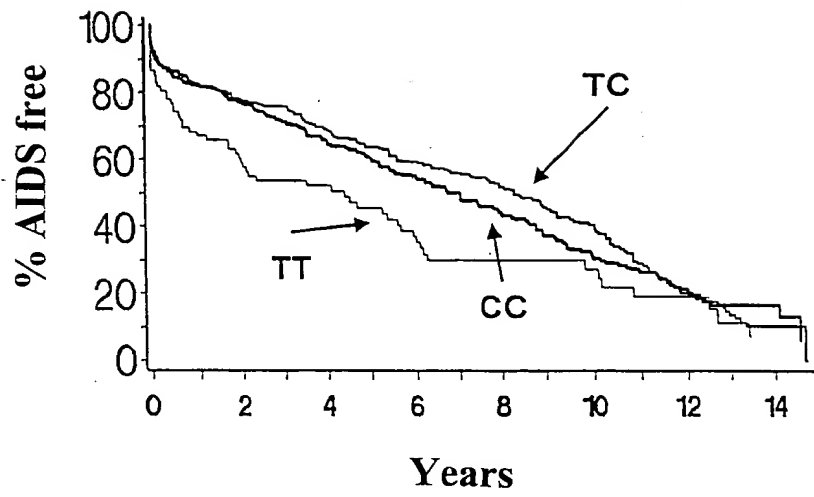


Fig. 11

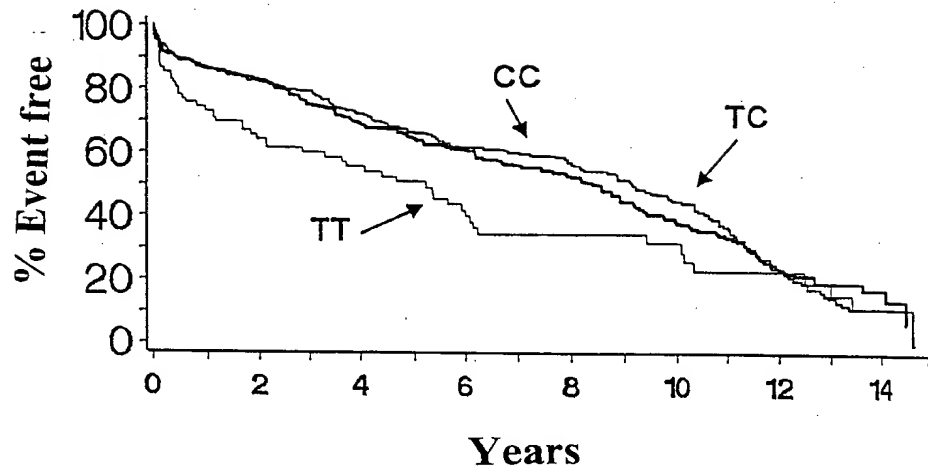


Fig. 12

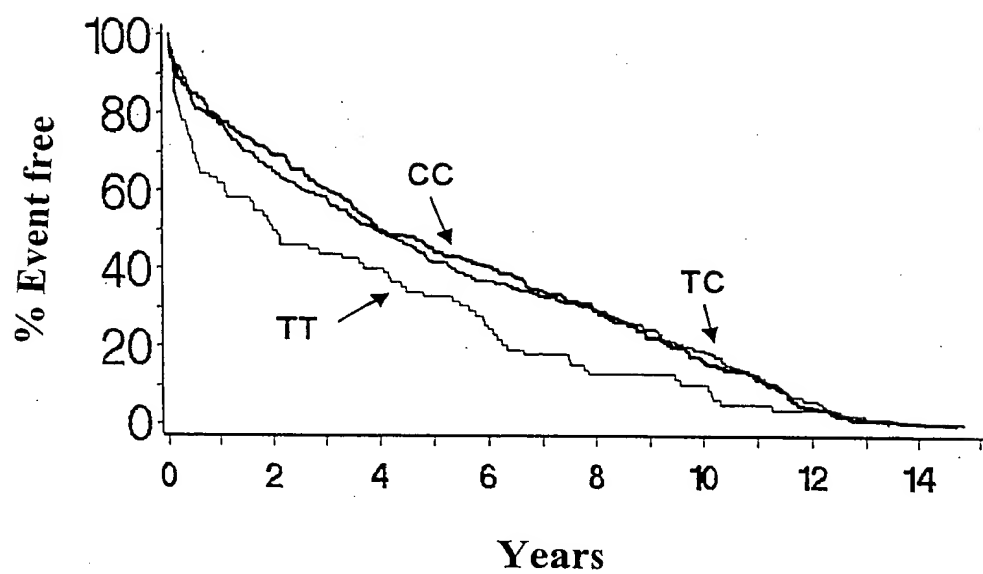




Fig. 13: Detection of Gbeta3s-2 by RT-PCR Gbeta3s-2

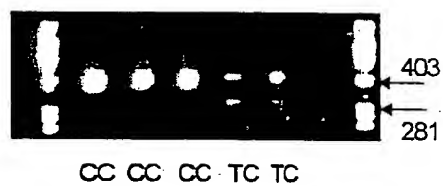


Fig. 14:

Potential structures of Gbeta3 and Gbeta3s/Gbeta3s-2

Potential Structures of G $\beta$ 3 and G $\beta$ 3s / G $\beta$ 3s-2

---

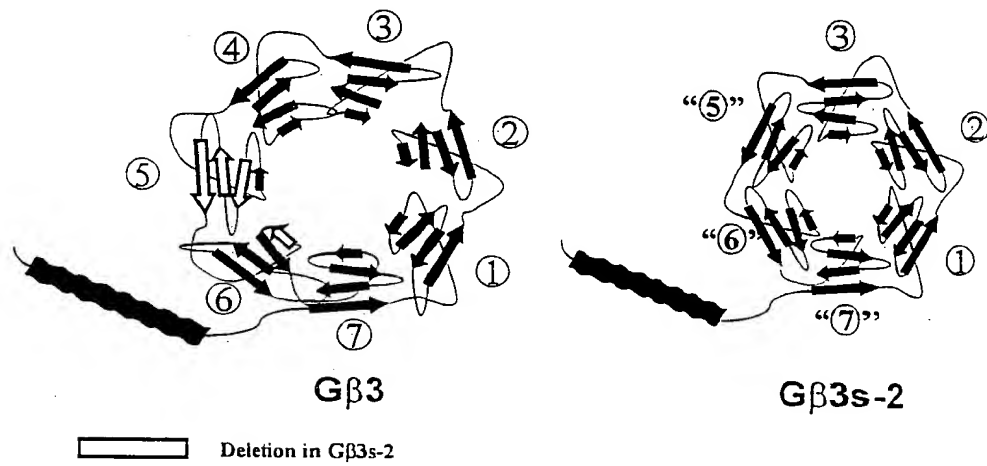


Fig. 15:  
Fortification of the G-protein-activation in sf9 cells by  
Gbeta3 splice variants

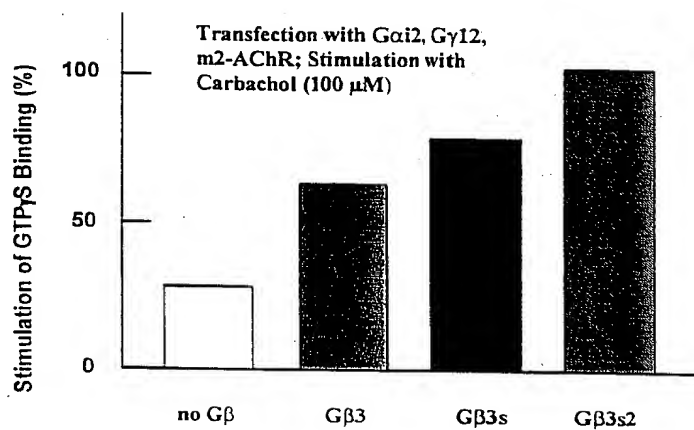
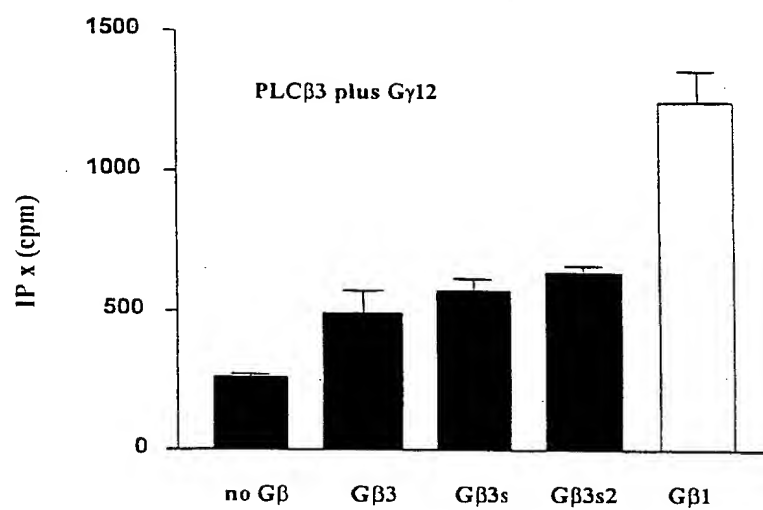


Fig. 16: Stimulation of the phospholipase C $\beta$ 3 by G $\beta$ 3



# Appendix: Location of the polymorphism in cDNA

## Anlage 1: beta3-original sequence of Levine

The exons are underlined alternately. The area which is omitted by cryptic splice is bold-face.

```

1  gggtcgATGG GGGAGATGGA GCAACTGCGT CAGGAAGCGG AGCAGCTCAA GAAGCAGATT
   Start ATG   EXON 3 after Ansari-Lari
   Nucleotides 1-6 seem not to be affected

61  GCAGATGCCA GGAAAGCCTG TGCTGACGTT ACTCTGGCAG AGCTGGTGTC TGGCCTAGAG
     /beginning EXON 4                                     /EXON 5 Beginn
                                                         ==> ENDE 1 KLON ANSARI

121 GTGGTGGGAC GAGTCCAGAT GCGGACGCGG CGGACGTAA GGGGACACCT GGCCAAGATT
     EXON 5

181 TACGCCATGC ACTGGGCCAC TGATTCTAAG CTGCTGGTAA GTGCCTCGCA AGATGGGAAG
     EXON 5                                     / beginning EXON 6

241 CTGATCGTGT GGGACAGCTA CACCACCAAC AAGGTGCACG CCATCCCACT GCGCTCCTCC
     EXON 6                                     / EXON 7

301 TGGGTTCATGA CCTGTGCCTA TGCCCCATCA GGGAACTTTG TGGCATGTGG GGGGCTGGAC
     EXON 7

361 AACATGTGTT CCATCTACAA CCTCAAATCC CGTGAGGGCA ATGTCAAGGT CAGCCGGGAG
     EXON 7

421 CTTCTGCTC ACACAGGTTA TCTCTCCTGC TGCCGCTTCC TGGATGACAA CAATATTGTG
     EXON 7                                     /EXON 8

481 ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTGTGCCTTG TGGGACATTG AGACTGGGCA GCAGAAGACT
     EXON 8                                     /EXON 9

                                     cryptic SPLICING
541 GTATTTGTGG GACACACGGG TGACTGCATG AGCCTGGCTG TGTCTCCTGA CTTCAATCTC
     EXON 9
     cryptic SPLICING

601 TTCAATTCGG GGGCCTGTGA TGCCAGTGCC AAGCTCTGGG ATGTGCGAGA GGGGACCTGC
     EXON 9
     cryptic SPLICING /

661 CGTCAGACTT TCACTGGCCA CGAGTCGGAC ATCAACGCCA TCTGTTTCTT CCCCAATGGA
     EXON 9                                     / beginning EXON 10

721 GAGGCCATCT GCACGGGCTC GGATGACGCT TCCTGCCGCT TGTTTGACCT GCGGGCAGAC
     EXON 10

781 CAGGAGCTGA TCTGCTTCTC CCACGAGAGC ATCATCTGCG GCATCACGTC CGTGGCCTTC
     EXON 10             polymorphism site             acgtc tgt

841 TCCCTCAGTG GCCGCCTACT ATTGCTGGC TACGACGACT TCAACTGCAA TGTCTGGGAC
     EXON 10

901 TCCATGAAGT CTGAGCGTGT GGGCATCCTC TCTGGCCACG ATAACAGGGT GAGCTGCCTG
     EXON 10             /beginning EXON 11

961 GGAGTCACAG CTGACGGGAT GGCTGTGGCC ACAGGTTCTT GGGACAGCTT CCTCAAATC
     EXON 11

1021 TGGAAGTGAa gaggtctggag aaaggggaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagccccc
      EXON 11
      End of Open Reading Frame

1081 tgcccgaccc catctcattc aggtgttctc ttctatatcc cgggtgccat tcccactaag
      EXON 11
  
```

1141 ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc ttgaggaggc agcatcaggg  
EXON 11

1201 acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtccctac  
EXON 11

1261 agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gccctccccc agccttttgc aggccagca  
EXON 11

1321 gacttgagtc tgaggcccca ggccttagga ttctccccc agagccacta cttttgtcca  
EXON 11

1381 ggcctgggtg gtatagggcg ttggccctg tgactatggc tctggcacca ctagggtcct  
EXON 11

1441 ggcctctctc ttattcatgc tttctccttt ttctaccttt tttctctccc taagacacct  
EXON 11

1501 gcaataaagt gtgacaccct ggt  
EXON 11 POLY A SITE

Appendix 2: Sequence with the two Polymorphism  
(Numbering after the Levine-Sequence)

```
1   ggggtcgATGG GGGAGATGGA GCAACTGCGT CAGGAAGCGG AGCAGCTCAA GAAGCAGATT
61  GCAGATGCCA GGAAAGCCTG TGCTGACGTT ACTCTGGCAG AGCTGGTGTG TGGCCTAGAG
121 GTGGTGGGAC GAGTCCAGAT GCGGACGCGG CGGACGTTAA GGGGACACCT GGCCAAGATT
181 TACGCCATGC ACTGGGCCAC TGATTCTAAG CTGCTGGTAA GTGCCTCGCA AGATGGGAAG
241 CTGATCGTGT GGGACAGCTA CACCACCAAC AAGGTGCACG CCATCCCACT GCGCTCCTCC
301 TGGGTCATGA CCTGTGCCTA TGCCCCATCA GGGAACTTTG TGGCATGTGG GGGGCTGGAC
361 AACATGTGTT CCATCTACAA CCTCAAATCC CGTGAGGGCA ATGTCAAGGT CAGCCGGGAG
421 CTTTCTGCTC ACACAGGTTA TCTCTCCTGC TGCCGCTTCC TGGATGACAA CAATATTGTG
481 ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTGTGCCTTG TGGGACATTG AGACTGGGCA GCAGAAGACT
541 GTATTTGTGG GACACACGGG TGA CTGCTGCTGA CTTCAATCTC
601 TTCATTTCGG GGGCCTGTGA TGCCAGTGCC AAGCTCTGGG ATGTGCGAGA GGGGACCTGC
661 CGTCAGACTT TCACTGGCCA CGAGTCGGAC ATCAACGCCA TCTGTTTCTT CCCCAATGGA
721 GAGGCCATCT GCACGGGCTC GGATGACGCT TCCTGCCGCT TGTGTGACCT GCGGGCAGAC
781 CAGGAGCTGA TCTGCTTCTC CCACGAGAGC ATCATCTGCG GCATCACGTC TGTGGCCTTC
841 TCCCTCAGTG GCCGCCTACT ATTCGCTGGC TACGACGACT TCAACTGCAA TGTCTGGGAC
901 TCCATGAAGT CTGAGCGTGT GGGCATCCTC TCTGGCCACG ATAACAGGGT GAGCTGCCTG
961 GGAGTCACAG CTGACGGGAT GGCTGTGGCC ACAGGTTTCT GGGACAGCTT CCTCAAAATC
1021 TGGAAC TGAG gaggtggag aaaggggaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagcccc
1081 tgcccgaccc catctcattc aggtgttctc ttctatattc cgggtgccat tcccactaag
1141 ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc tttgggaggc agcatcaggg
1201 acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtectcac
1261 agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gccctcccc agccctttgc agggccagca
1321 gacttgagtc tgagggccca ggccttagga ttccctcccc agagccacta cctttgtcca
1381 ggcctgggtg gtatagggcg tttggccctg tgactatggc tctggcacta ctagggtcct
1441 ggcctctctt ttattcatgc tttctccttt ttctaccttt ttttctctcc taagacacct
1501 gcaataaagt gtagcaccct ggt
```

481 ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTG ~~AGCGCTTC TCGGACATTC AGACATGGGCAACGACAGAGCT~~  
EXON 8 / EXON 9



5017 GAGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG

EXON 9

5018 AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG

EXON 9

Deletion in cB2

661 CGTCAGACTT TCACTGGCCA CGAGTCGGAC ATCAACGCCA TCTGTTT TCACTGGCCA

EXON 9

/ beginning EXON 10

Intron between 1607 bp

Deletion in cB2

721 GAGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG

EXON 10

781 GAGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG AGACAGGCG

EXON 10

polymorphism site C825T:

acgtc tgt

841 TCCCTCAGTG GCCGCCTACT ATTCGCTGGC TACGACGACT TCAACTGCAA TGTCTGGGAC

EXON 10

901 TCCATGAAGT CTGAGCGTGT GGGCATCCTC TCTGGCCACG ATAACAGGGT GAGCTGCCTG

EXON 10

/beginning EXON 11 (Intron between 989 bp)

961 GGAGTCACAG CTGACGGGAT GGCTGTGGCC ACAGGTTTCCT GGGACAGCTT CCTCAAAATC

EXON 11

1021 TGGAAGTGA gaggctggag aaagggaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagccccc

EXON 11

End of Open Reading Frame B3-3

1081 tgcccgaccc catctcattc aggtgttctc ttctatatc cgggtgccat tccactaag

EXON 11

1141 ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc ttggggaggc agcatcaggg

EXON 11

1201 acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtcctcac

EXON 11

1261 agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gcccctcccc agccctttgc aggcccagca  
EXON 11

1321 gacttgagtc tgaggcccca ggccttagga ttctctcccc agagccacta ctttgtcca  
EXON 11

1381 ggcctgggtg gtatagggcg tttggccctg tgactatggc tctggcaca ctagggtcct  
EXON 11

1441 ggcctcttc ttattcatgc tttctccttt ttctaccttt tttctctcc taagacacct  
EXON 11

1501 gcaataaagt gtagcaccct ggt  
EXON 11 POLY A SITE

Appendix 4: Amino acid sequence of Gbeta3s-2

Combined description

1	Met	Gly	Glu	Met	Glu	Gln	Leu	Arg	Gln	Glu	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys	Lys	16
1	ATG	GGG	GAG	ATG	GAG	CAA	CTG	CGT	CAG	GAA	GCG	GAG	CAG	CTC	AAG	AAG	48
17	Gln	Ile	Ala	Asp	Ala	Arg	Lys	Ala	Cys	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Ala	Glu	32
49	CAG	ATT	GCA	GAT	GCC	AGG	AAA	GCC	TGT	GCT	GAC	GTT	ACT	CTG	GCA	GAG	96
33	Leu	Val	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Val	Gly	Arg	Val	Gln	Met	Arg	Thr	Arg	48
97	CTG	GTG	TCT	GGC	CTA	GAG	GTG	GTG	GGA	CGA	GTC	CAG	ATG	CGG	ACG	CGG	144
49	Arg	Thr	Leu	Arg	Gly	His	Leu	Ala	Lys	Ile	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Ala	64
145	CGG	ACG	TTA	AGG	GGA	CAC	CTG	GCC	AAG	ATT	TAC	GCC	ATG	CAC	TGG	GCC	192
65	Thr	Asp	Ser	Lys	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Leu	Ile	80
193	ACT	GAT	TCT	AAG	CTG	CTG	GTA	AGT	GCC	TCG	CAA	GAT	GGG	AAG	CTG	ATC	240
81	Val	Trp	Asp	Ser	Tyr	Thr	Thr	Asn	Lys	Val	His	Ala	Ile	Pro	Leu	Arg	96
241	GTG	TGG	GAC	AGC	TAC	ACC	ACC	AAC	AAG	GTG	CAC	GCC	ATC	CCA	CTG	CGC	288
97	Ser	Ser	Trp	Val	Met	Thr	Cys	Ala	Tyr	Ala	Pro	Ser	Gly	Asn	Phe	Val	112
289	TCC	TCC	TGG	GTC	ATG	ACC	TGT	GCC	TAT	GCC	CCA	TCA	GGG	AAC	TTT	GTG	336
113	Ala	Cys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Met	Cys	Ser	Ile	Tyr	Asn	Leu	Lys	Ser	128
337	GCA	TGT	GGG	GGG	CTG	GAC	AAC	ATG	TGT	TCC	ATC	TAC	AAC	CTC	AAA	TCC	384
129	Arg	Glu	Gly	Asn	Val	Lys	Val	Ser	Arg	Glu	Leu	Ser	Ala	His	Thr	Gly	144
385	CGT	GAG	GGC	AAT	GTC	AAG	GTC	AGC	CGG	GAG	CTT	TCT	GCT	CAC	ACA	GGT	432
145	Tyr	Leu	Ser	Cys	Cys	Arg	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Asn	Ile	Val	Thr	Ser	160
433	TAT	CTC	TCC	TGC	TGC	CGC	TTC	CTG	GAT	GAC	AAC	AAT	ATT	GTG	ACC	AGC	480
161	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Cys	Ala	Leu	Trp	Asp	Ile	Glu	Thr	Gly	Gln	Gln	176
481	TCG	GGG	GAC	ACC	ACG	TGT	GCC	TTG	TGG	GAC	ATT	GAG	ACT	GGG	CAG	CAG	528
177	Lys	Thr	Val	Phe	Val	Gly	His	Thr	Gly	Asp	Cys	Met	Ser	Leu	Ala	Val	192
529	AAG	ACT	GTA	TTT	GTG	GGA	CAC	ACG	GGT	GAC	TGC	ATG	AGC	CTG	GCT	GTG	576
193	Ser	Pro	Asp	Phe	Asn	Leu	Phe	Ile	Ser	Gly	Ala	Cys	Asp	Ala	Ser	Ala	208
577	TCT	CCT	GAC	TTC	AAT	CTC	TTC	ATT	TCG	GGG	GCC	TGT	GAT	GCC	AGT	GCC	624

209 Lys Leu Trp Asp Val Arg Glu Gly Thr Cys Arg Gln Thr Phe Thr Gly 224  
625 AAG CTC TGG GAT GTG CGA GAG GGG ACC TGC CGT CAG ACT TTC ACT GGC 672

225 His Glu Ser Asp Ile Asn Ala Ile Cys Phe Phe Ser Leu Ser Gly Arg 240  
673 CAG GAG TCG GAC ATC AAC GCC ATC TGT TTC TTC TCC CTC AGT GGC CGC 720

241 Leu Leu Phe Ala Gly Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Asn Val Trp Asp Ser 256  
721 CTA CTA TTC GCT GGC TAC GAC GAC TTC AAC TGC AAT GTC TGG GAC TCC 768

257 Met Lys Ser Glu Arg Val Gly Ile Leu Ser Gly His Asp Asn Arg Val 272  
769 ATG AAG TCT GAG CGT GTG GGC ATC CTC TCT GGC CAC GAT AAC AGG GTG 816

273 Ser Cys Leu Gly Val Thr Ala Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser 288  
817 AGC TGC CTG GGA GTC ACA GCT GAC GGG ATG GCT GTG GCC ACA GGT TCC 864

289 Trp Asp Ser Phe Leu Lys Ile Trp Asn \*\*\*  
865 TGG GAC AGC TTC CTC AAA ATC TGG AAC TGA

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**